Gene Pulser Xcell™
エレクトロポレーションシステム
取扱説明書

Catalog Numbers

165-2660 J1　165-2666
165-2661 J1　165-2667
165-2662 J1　165-2668
165-2669



ご使用前に

この取扱説明書を十分お読みください。
なお、この取扱説明書は紛失しないように製品の近くに保存してください。

BIO-RAD

目　次

第１章　Gene Pulser Xcell エレクトロポレーションシステムの概要と安全性

Gene Pulser Xcellは、コンデンサを用いることにより減衰波および矩形波を発生させ、細胞へのエレクトロポレーションを行う装置です。この装置は高電圧回路使用時には最大3000V、低電圧回路では最大500Vまでの電気パルスを発生させることができます。パルス発生の際、高電圧回路ではGene Pulser Xcell main unit内蔵のコンデンサ（10、15、25μFに設定可能）を使用し、低電圧回路ではCE moduleのコンデンサを使用します。減衰波および矩形波は、一般に広く使用されている波形です。２つの波形についての詳細は第４章に記載されています。

Gene Pulser Xcellはモジュール方式を採用しており、main unitと２つのアクセサリー(CE moduleとPC module)からなります。さらにShock Podショッキングチャンバーと電極の付いたのキュベットを使用します。

CE moduleは主に、哺乳動物細胞や植物プロトプラスト等の真核生物細胞を対象としたエレクトロポレーションに使用されます。CE moduleは抵抗値が1000Ω未満のエレクトロポレーション・メディウムにのみ使用できます。減衰波の場合、CE moduleは回路のコンデンサー容量を制御し、パルスのタイムコンスタントを増加させます。矩形波の場合、CE moduleは抵抗値の低いエレクトロポレーション・メディウムに矩形波を供給するために必要なコンデンサ容量を提供します。CE moduleには、50μFから3275μFまで25μF刻みで設定できるように、複数のコンデンサが含まれています。矩形波の場合は、抵抗値の低いエレクトロポレーション・メディウムにパルスを供給するために必要な大きなコンデンサ容量（3275μF）を提供します。

PC moduleは主に、菌類や細菌をターゲットとした矩形波によるエレクトロポレーションに使用されます。また、少量で高抵抗なサンプルへ、高電圧のパルスを供給するようなアプリケーションでも使用されます。PC moduleは50Ωから1000Ωまで、50Ω刻みで抵抗値を設定することができます。この装置は、サンプルと並列な位置に抵抗器を接続することで、回路全体の抵抗値を制御します。これにより、減衰波のタイムコンスタントは減少します。高抵抗なエレクトロポレーション・メディウムを使用している場合は、効果的なタイムコンスタントの制御が行われますが、低抵抗なメディウムでは効果は低くなります。PC moduleは高電圧設定時のアーク放電の発生を抑えます。PC moduleを矩形波発生時に使用すると、電圧の低下（droop）が増加してしまうため、通常は使用しません。

PC moduleおよびCE moduleにはmain unitと接続するためのケーブルが付いており（第２章を参照）、ともにmain unitの前面にあるパネルから制御されます。

1.1　安全性に関する情報

この装置は安全性についてはEN61010を、EMCについてはEN61326（Class A）を満たすよう設計されています。通常の試験･研究目的で使用する範囲においては、電磁放射に関してClass A基準に適合しています。この装置は試験･研究目的専用です。この装置からの電磁放射は、近くや同一屋内配線に設置されたある種の高感度な電気製品に影響を与える場合があります。使用の際はこれらの可能性を考慮し、十分な対策を取る必要があります。

外装に明らかな損傷のある場合や画面表示が取扱説明書通りに動作しない場合は、Gene Pulser Xcellの使用は避けてください。この装置は、ケーブルやShockPodも含め付属の製品以外の装置とは接続できません。Gene Pulser Xcellおよび付属品の使用温度は0～35℃です。

お客様の手で修理･交換可能な部品はありません。外装を開けたりセーフティ･インターロックを外したりしないで下さい。この装置はいかなる場合でも改造はできません。装置の改造は以下の問題の原因となります。
・ 製品の保証対象外となります。
・ 規格の対象外となります。
・ その他の障害をもたらす可能性があります。
バイオ・ラッドは、適正な目的以外での使用や装置の改造による故障や事故について一切の責任を負いません。

1.2　電気的な安全性に関する注意

Gene Pulser Xcellは最大で3000Vの電圧を発生させるため、非常に高い電流を流す可能性があります。最大電圧まで蓄電した状態では、装置にはおよそ400Jのエネルギーが蓄積されています。このレベルのエネルギーを扱う上で求められる適切な注意が必要です。安全性を考慮した構造により、使用者は接続用のジャックやショッキングチャンバー内部の電極に触れることはありません。機能的なセーフティ・インターロックを絶対に回避しないでください。

PULSEボタンは画面右下の“ P ”が点滅しているときに有効です。PULSEボタンを押し“ Pulsing ”の文字が画面に表示されているときは、装置は高電圧な状態にあります。内蔵のセーフティ･インターロックにより、ShockPodの蓋が開いているときはキュベットにパルスが供給されることはありません。コンデンサが不完全に蓄電し、パルスが発生していない状態（例えば、パルス発生前に蓄電が中断された場合など）では、装置内部に電気が残っていることがあります。この電気は１～２分で放電されます。システムの構造上、使用者が蓄電している部分に触れることはありません。

1.3　機械的な安全性に関する注意

Gene Pulser Xcellは特許取得のアーク放電保護回路を内蔵しており、サンプルへ高電圧を供給する際のアーク放電の発生は抑えられています。装置に含まれる回路はアーク放電の兆候とサンプルからの交流電流を10μ秒以内に感知し、ShockPodで生じる機械的、視覚的、聴覚的な現象を防ぐもしくは最小限に抑えます。アーク放電が起きてしまった場合、ショッキングチャンバーはこれらの小さな放電を封じ込めるのに効果的ですが、それでも、この装置を使用する際には安全メガネの着用を推奨します。

1.4　その他の安全性に関する注意

必ずアースを接続してご使用ください。
装置に液体がかからないようにしてください。筐体のクリーニングには水かアルコールでぬらしたペーパータオルや布を使用してください。

ケーブル類は装置に同梱されている物を使用してください。

ShockPodは組み立てられた状態で使用してください。セーフティ･インターロックを改造した状態や、分解した状態での使用は禁止されています。

表示画面は定期的に点検してください。

Gene Pulser Xcellエレクトロポレーションシステムを使用する前に、必ず取扱説明書（本書）を読んでください。
技術的なお問合せはバイオ・ラッドの各営業所かテクニカル・コール（03-5811-6271）までご連絡ください。

警告： Gene Pulser Xcellは無線通信の周波数帯を使用し、放出します。取扱説明書に記載された以外の方法で使用すると、無線通信に干渉を及ぼす可能性があります。Gene Pulser Xcellは、適切な環境で使用された場合の外部への干渉に関して適切な対策がとられていることを示すClass A基準を満たすことが確認されています。居住区画で装置を使用すると干渉が生じやすいことがあります。このような場合は、干渉に対して何らかの策を講じる必要があります。

第2章　開梱と設置

Gene Pulser Xcellには必要なアクセサリーに合わせて３種類のシステムがあります。

165-2660J1　Gene Pulser Xcellコンプリートシステム。100-240V、50/60Hz。減衰波および矩形波を供給。main unit、CE module、PC module、ShockPod、エレクトロポレーションキュベット（0.1cm、0.2cm、0.4cm）各50個、取扱説明書を含む。

165-2661J1　Gene Pulser Xcell CEシステム。100-240V、50/60Hz。減衰波（25-3275μF）および矩形波を供給。main unit、CE module、ShockPod、エレクトロポレーションキュベット（0.2cm、0.4cm）各50個、取扱説明書を含む。

165-2662J1　Gene Pulser Xcell PCシステム。100-240V、50/60Hz。減衰波および矩形波を供給。main unit、PC module、ShockPod、エレクトロポレーションキュベット（0.1cm、0.2cm）各50個、取扱説明書を含む。

165-2666J1　Gene Pulser Xcellコアユニット。100-240V、50/60Hz。main unit、ShockPod、取扱説明書を含む。

165-2666

Gene Pulser Xcell main unit。100-240V、50/60Hz。

165-2667

Gene Pulser Xcell CE module。25-3275μF。取扱説明書を含む。

165-2666

Gene Pulser Xcell PC module。50-1000Ω。

165-2666

2.1　開梱

適切なコンセントに近く、平らで乾いた場所で全ての構成品を取り出します。

開梱の際には、構成品の確認をお願いいたします。万一、欠品や損傷が見られる場合はバイオ・ラッドまでご連絡ください。

2.2　システムの設置

2.2.1　Gene Pulser Xcell main unitの設置とShockPodの接続
（カタログ番号　165-2660J1、165-2661J1、165-2662J1、165-2666J1）

以下の手順でGene Pulser Xcell main unitの設置とShockPodの接続を行います。パワーコードやその他のケーブル類を抜き差しする際は、必ず電源がOFFになっていることを確認してください。

1．Gene Pulser Xcell main unitの背面にあるコネクターにパワーコードを接続します（図2.1A）。パワーコードを適切なアースの取れたコンセントに接続します。底面にある脚を引き出すことで、LCD画面の角度を変更することができます（図2.1B）。
2．ShockPodのコネクターをGene Pulser Xcell main unitの前面にあるジャックに差し込みます。このとき、向かって左側と中央のジャックを使用します（図2.2）。エレクトロポレーションでは極性は重要ではありません。右側のジャックはShockPodと共に使用することはありません。
3．装置の右側面に あるスイッチを押し、Gene Pulser Xcellの電源を入れてください。

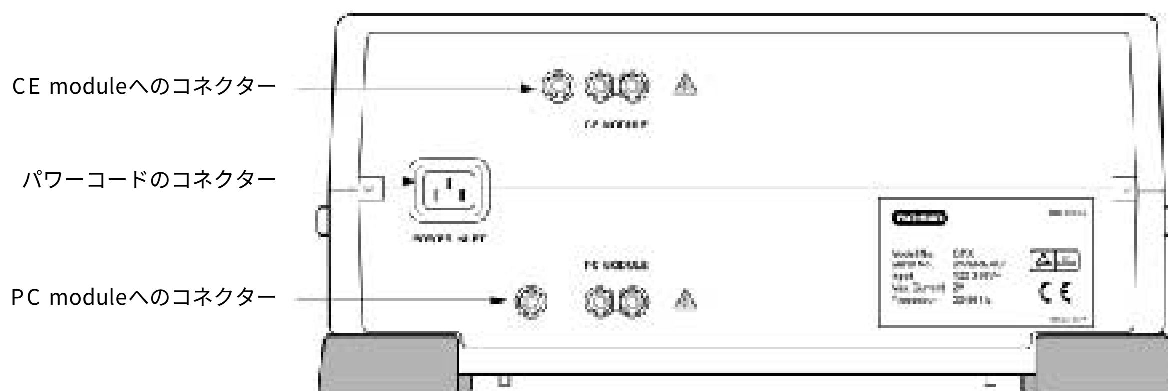


図2.1A　Gene Pulser Xcell main unitの背面パネル。
パワーコード、CE module、PC moduleのためのコネクターがあります。

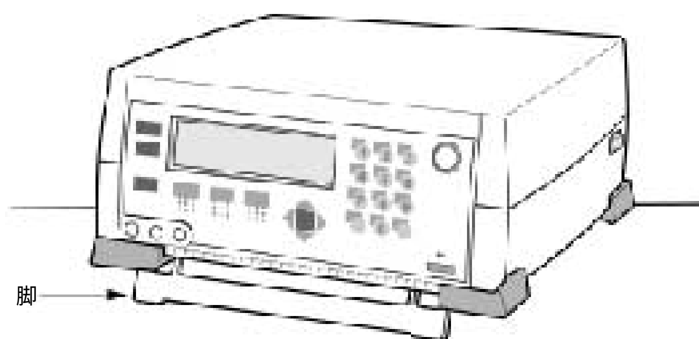


図2.1B　底部の脚を引き出して前面パネルの角度を変えます。

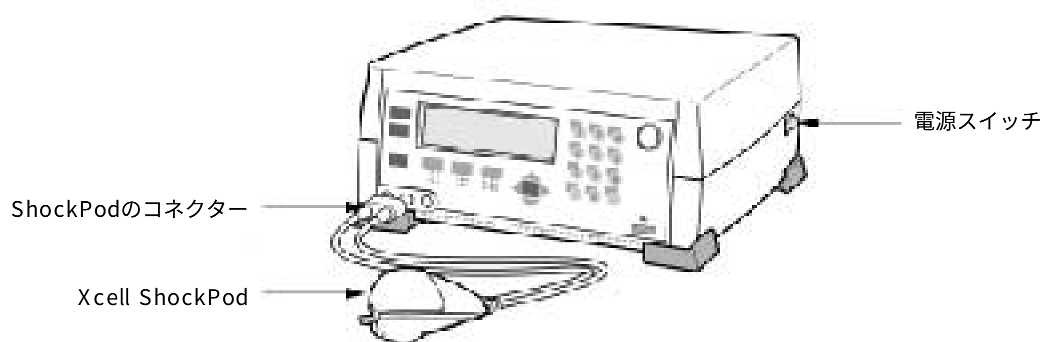


図2.2　Gene Pulser Xcell main unitへShockPodを接続します。

2.2.2　PC moduleとGene Pulser Xcell main unitの接続
（カタログ番号　165-2660J1、165-2662J1、165-2668）

PC moduleとCE moduleは同時にGene Pulser Xcell main unitへ接続することが可能で、接続の順序は問いません。PC moduleを接続する前に、必ずGene Pulser Xcell main unitの電源を切ってください。PC moduleには電源スイッチはついていません。Gene Pulser Xcell main unitから制御されます。

1．PC moduleをGene Pulser Xcell main unitの近くにおきます。CE moduleも含め、これらの装置は重ねることができます。重ねる順序は任意です。上に重ねる装置の足を下の装置の角に合わせて設置します。
2．Gene Pulser Xcell main unitの背面にあるコネクターにPC moduleの背面から伸びているケーブルを差し込みます（図2.3）。ケーブルのコネクターは、正しい位置に正しい向きで差し込めるように結束されています。

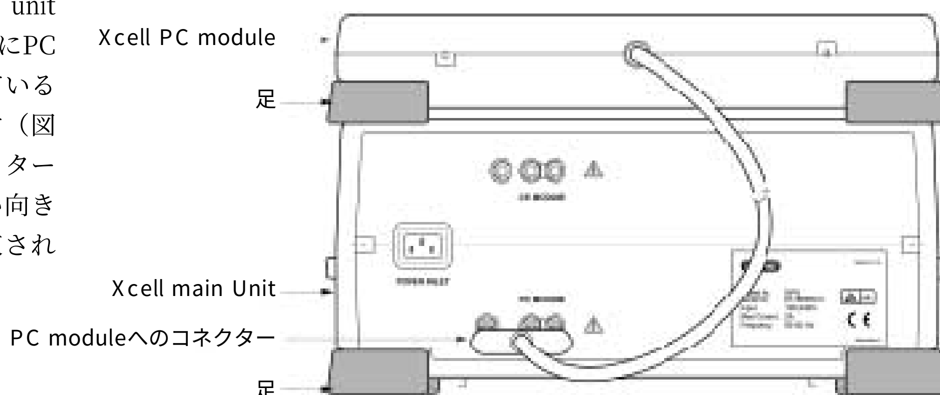


図2.3　PC moduleをGene Pulser Xcell main unitへ接続する方法（背面図）。

2.2.3　CE moduleとGene Pulser Xcell main unitの接続
（カタログ番号　165-2660J1、165-2661J1、165-2667）

PC moduleとCE moduleは同時にGene Pulser Xcell main unitへ接続することが可能で、接続の順序は問いません。CE moduleを接続する前に、必ずGene Pulser Xcell main unitの電源を切ってください。CE moduleには電源スイッチはついていません。Gene Pulser Xcell main unitから制御されます。

1．CE moduleをGene Pulser Xcell main unitの近くにおきます。PC moduleも含め、これらの装置は重ねることができます。重ねる順序は任意です。上に重ねる装置の足を下の装置の角に合わせて設置します。
2．Gene Pulser Xcell main unitの背面にあるコネクターにCE moduleの背面から伸びているケーブルを差し込みます（図2.4）。ケーブルのコネクターは、正しい位置に正しい向きで差し込めるように結束されています。

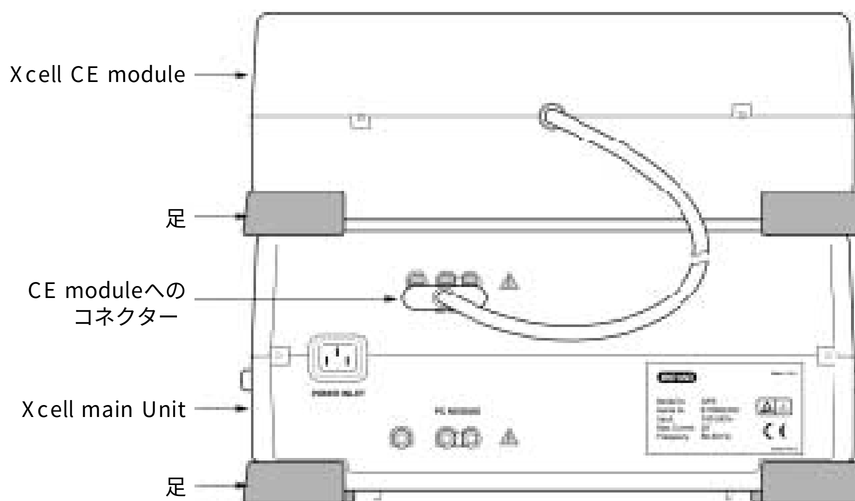


図2.4　CE moduleをGene Pulser Xcell main unitへ接続する方法（背面図）。

2.2.4　ShockPod（カタログ番号　165-2660J1、165-2661J1、165-2662J1、165-2669）

ShockPodは片手で操作できるようデザインされています。前部にあるタブを押すと、留め金が外れて蓋が開きます。上部を静かに押して蓋を閉じます。システムの安全設計上、パルス発生時には蓋が閉じている必要があります。エレクトロポレーション・メディウムの抵抗値を測定する際にもShockPodは閉じている必要があります（§3.9.1参照）。ShockPod内蔵のセーフティ・インターロックにより、蓋が開いている時はキュベットにパルスが供給されることはありません。

バイオ・ラッドのキュベットは電極の付いていない壁面の一方に突起がついており、誤った向きで挿入することを防ぐことができます。

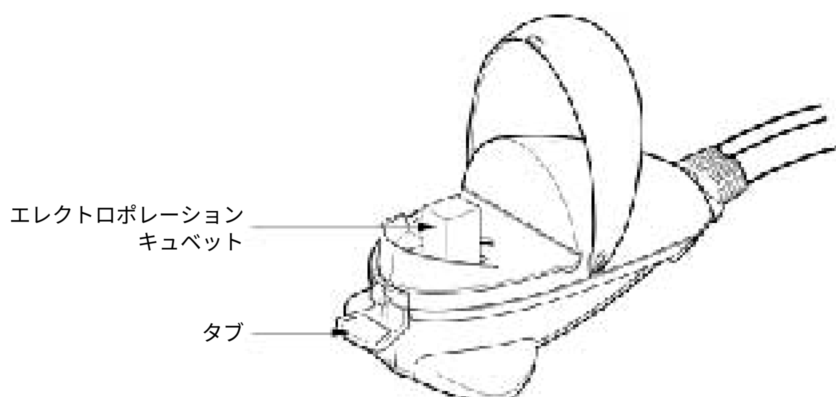


図2.5　ShockPodとキュベット

電極を覆うカバーは汚れた電極をクリーニングするために外すことができます。以下の手順でクリーニングします。

1．ShockPodをGene Pulser Xcell main unitから外します。
2．タブを押し、蓋を開きます。
3．プラスドライバーを用いてセーフティ・パネルを固定しているネジをはずします（図2.5）。セーフティ・パネルを持ち上げて外します。
4．綿棒と暖かい石鹸水で電極や周辺部をクリーニングします。乾いた綿棒かキムワイプで電極を乾燥させます。

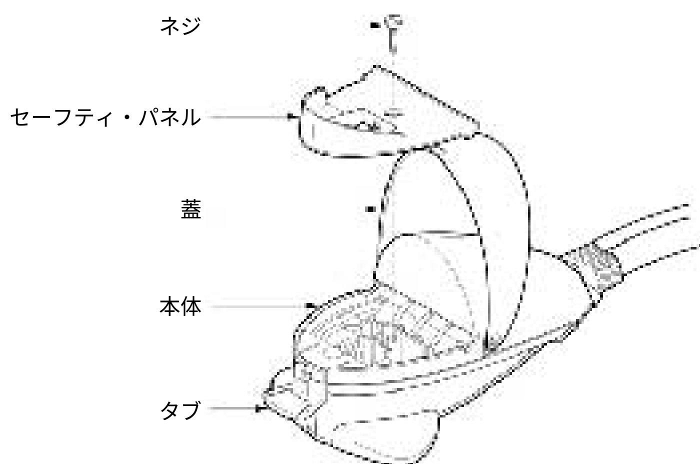


図2.6　Gene Pulser Xcell ShockPodの分解図

第3章　操作方法

3.1　概要

この章にはGene Pulser Xcellの操作方法について記載されています。以下にこの章の概要を示します。

§3.2からは操作パネルのキー、Home画面、Help機能について記載されています。
・Gene Pulser Xcellはmain unitの前面パネルにあるキーで操作します。§3.2.1にはこれらのキーの使用方法が記載されています。
・Home画面からは保存されているプロトコールやパラメータの入力画面を呼び出すことができます。§3.2.2にはこれらのプログラムについての記載があります。
・Gene Pulser XcellにはHelp機能が内蔵されています。この機能は全ての画面から呼び出すことができます。詳細は§3.2.3に記載されています。

Gene Pulser Xcellには、マニュアル操作、プリセット･プロトコール、ユーザー･プロトコールの３種類の使用方法があります。
・§3.3にはマニュアル操作について記載されています。マニュアル操作で、減衰波および矩形波を供給するために必要なパラメータの設定を行います。
  ・§3.3.2には減衰波についての記載があります。
  ・§3.3.3にはタイムコンスタントが指定された減衰波について記載されています。
  ・§3.3.4には矩形波についての記載があります。
  ・§3.3.6には自作したプログラムをユーザー･プロトコールとして保存するための方法について記載されています。
・§3.4には、一般的に広く用いられている細菌や菌類、哺乳動物細胞について用意されているプリセット･プロトコールについて記載されています。
  ・プリセット･プロトコールは呼び出してそのまま使用する（§3.4.2）ことも、編集した後に使用する（§3.4.3）こともできます。
  ・編集したプロトコールはユーザー･プロトコールとして保存することができます（§3.4.4）。
・§3.5には、ユーザーが作成したプロトコール（ユーザー･プロトコール）について記載されています。
  ・ユーザー･プロトコールは次の４つの方法で作成します。
    ・ユーザー･プロトコール として新規に作成する。
    ・既存のユーザー･プロトコールを編集、変更する。
    ・マニュアル操作で新規に作成する。
    ・プリセット･プロトコールを編集する。
  ・ユーザー･プロトコールは、一度保存してしまえばプリセット･プロトコールと同様に呼び出して使用することができます（§3.5.1）。

3.2　前面パネルとHome画面

3.2.1　キーパッド

図3.1は前面パネルの外観を示しています。

英数字キー：これらのキーはGene Pulser Xcellに数字や文字を入力するために使用します。シフトキーを押すことで、アルファベットと数字の切り替えを行います。アルファベットを入力するためには、シフトキーでアルファベット・モードに切り替え、該当する文字のキーを押します。例えば、「ａ」を入力するには「２」のキーを１回押します。「ｂ」の場合は２回、「ｃ」の場合は３回押します。「ａｂ」のように同じキーを続けて使う場合は、矢印キーを用いてカーソルを移動させます。Gene Pulser Xcellのファームウェアは、必要に応じて自動的にアルファベットと数字の切り替えを行います。Protocol画面とDirectory画面では２桁の入力が必要ですが、２桁目の入力は１桁目の入力後、２秒以内に行う必要があります。２桁目の入力が行われなかった場合、表示は初期値に戻ります。

HOMEキー：どのような場面からでも、Home画面に戻ることができます。

BACKキー：Home画面に向かって１段階上の階層に移動することができます。

HELPキー：Help画面を表示します。

Saveキー：ユーザー名やユーザー・プロトコールを保存します。

Deleteキー：枠内の最後の入力を取り消します。また、ユーザー名やユーザー・プロトコールを削除します。

Clearキー：枠内の文字を全て消去します。

ENTERキー：内容を決定し、次の項目へ移ります。

矢印キー：上下の矢印キーを押すと、カーソルは上下の列に移動します。左右の矢印キーは、状況に応じて次のような働きをします。（１）カーソルを左右に移動させます。（２）いくつかのメニュー表示画面において、画面の切り替えを行います。（３）数値の上下を行います。

PULSEボタン：電気パルスを発生させます。このとき、画面には“ Pulsing ”と表示されます。ブザーが鳴り、パルスが発生したことを示します。複数のパルスを発生させた場合は、最後のパルスの後にブザーがなります。パルスは、ShockPodが接続されており、蓋が閉まっている場合に発生します。そうでない場合は、装置内部に安全に放出されます。

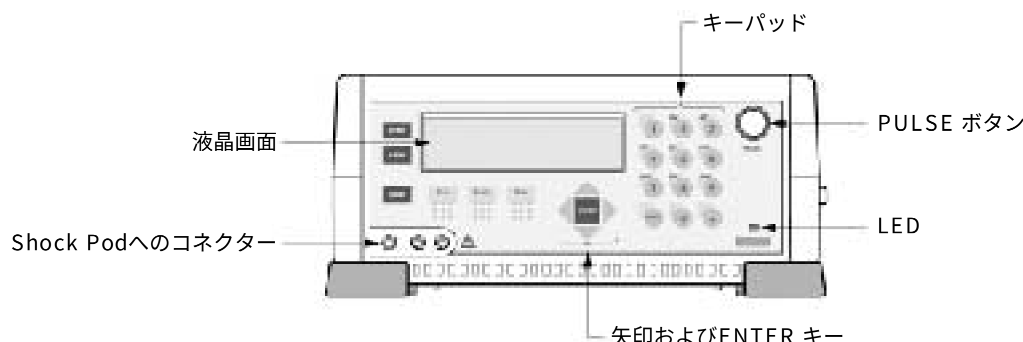


図3.1　Gene Pulser Xcellの前面パネル。詳細は§3.2.1を参照。

3.2.2　Home画面

Gene Pulser Xcellの電源を入れると、Pulse Trac機能（§3.11を参照）とファームウェアのチェックを含む自己診断アルゴリズムが自動的に働きます。このとき、画面にはバイオ・ラッドのロゴと製品名、ファームウェアのバージョンが表示されます。この起動作業が終わるとHome画面（図3.2）が表示されます。この画面から、下記のプログラムに入ります。他の画面でHOMEキーを押すと、直ちにHome画面に戻ることができます。

Home画面は２つの画面からなります。１つ目の画面には一般的に多く使用されるプログラムが表示されます。２つ目の画面には応用的な機能を含むプログラムが表示されます。左右の矢印キーを用いて、これら２つの画面の切り替えを行います。

Home画面が表示された状態で英数字キーの対応する番号を押すと、目的のプラグラムを選択することができます。上下の矢印キーでカーソルを移動しENTERキーを押すことでも、同様にプログラムの選択を行うことができます。

１．Exponential protocol：　減衰波の供給を行います。各種の条件を入力し、減衰波を供給することができます。

２．Time constant protocol：　タイムコンスタントを指定し、減衰波の供給を行います。各種の条件を入力し、減衰波を供給することができます。

３．Square wave protocol：　矩形波の供給を行います。各種の条件を入力し、矩形波を供給することができます。

４．Pre-set protocols：　広く使用されている細菌、菌類、哺乳動物細胞への設定条件があらかじめ保存されています。

５．User protocols：　ユーザー・プロトコールを最大144件保存することができます。保存されているプロトコールは自由に呼び出して使用することができます。

６．Last pulse：　直前に使用した実験条件を呼び出し、使用することができます。

７．Optimize：　設定した条件のうち、電圧の値をパルスごとに一定の割合で変化させてゆくことができます。これにより、条件検討時の入力の手間が軽減されます。

８．Data management：　過去100件分の実験条件と結果を日付と時間を元に呼び出すことができます。

９．Measurement：　Gene Pulser Xcell main unitとCE moduleのコンデンサ容量を測定することができます。また、サンプルの抵抗値を測定することもできます。

10．User Preferences：　時計、画面の輝度、画面のスリープ機能を設定することができます。

２つのHome画面には左右の矢印（＞および＜）が表示されます。これらは、左右の矢印キーを用いて画面の切り替えができることを示しています。

Home画面

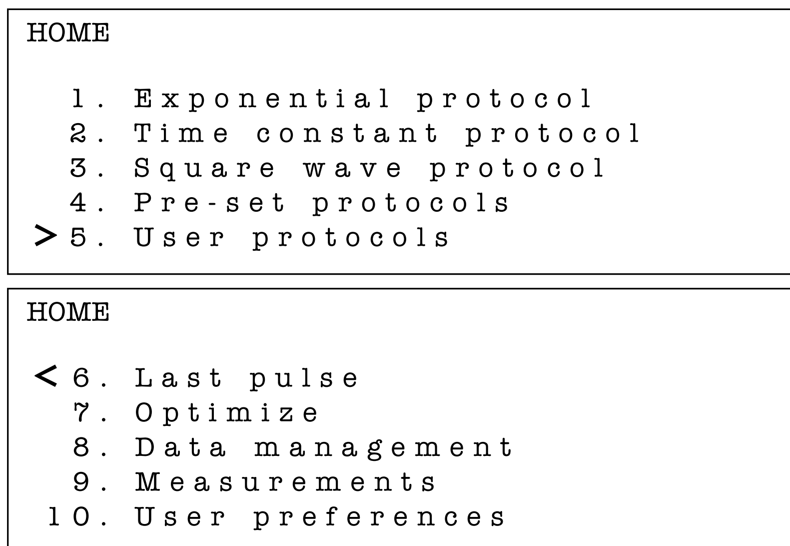


図3.2　Gene Pulser XcellのHome画面。この画面から全ての機能を呼び出すことができます。他の全ての画面でHOMEキーを押すと、　Home画面に戻ることができます。左右の矢印キーを用いて２つの画面の切り替えを行います。

3.2.3　Help画面

任意の画面でHelpキーを押すことで、Help画面を表示させることができます。Help画面には、次に行うべきキー操作が示されます。Help画面が複数ある場合は、左右の矢印キーで画面をスクロールさせます。BACKキーにより、元の画面に戻ることができます。

3.3　マニュアル操作

3.3.1　マニュアル操作のクイックガイド

・Home画面で以下の操作を行います。
　・減衰波を使用する場合はENTERキーを押します。
　・タイムコンスタントを指定する減衰波を使用する場合は、「２」に次いでENTERキーを押します。
　・矩形波を使用する場合には、「３」に次いでENTERキーを押します。
・上下の矢印キーを使用して条件の入力位置を選択します。必要な入力位置が選択されている状態で、数字キーを用いて任意の値を入力します。ENTERキーにより値を決定します。
・必要な条件が入力されると、Gene Pulser XcellのPULSEボタンが使用可能になります。
・PULSEボタンを押し、エレクトロポレーションを実行します。
・BACKキーを押すとProtocol Detail画面が表示され、次の実験に移ることができます。

3.3.2　減衰波を用いたエレクトロポレーション

減衰波を用いたエレクトロポレーションの原理については、§4.1に記載があります。

・Home画面（図3.2）では、１番の“ Exponential　protocol ”がデフォルトで選択されています。この状態でENTERキーを押すと、Protocol Detail画面（図3.3）が表示されます。Home画面で“ Exponential protocol ”が選択されていない場合は、「１」もしくは上下の矢印キーで“ Exponential protocol ”を選択し、ENTERキーを押すことでProtocol Detail画面が表示されます。
・以下の組み合わせの条件を入力することができます。
　　コンデンサ容量＋電圧
　　コンデンサ容量＋電圧＋抵抗

上記の３つの値はどのような順番で入力することもできますが、設定した電圧により、高電圧回路、低電圧回路のどちらを使用するのかが決定され、コンデンサ容量は、表3.1に示されているような制限を受けます。コンデンサ容量を設定可能な範囲の外に入力した場合、自動的に範囲内の最も近い値に変更されます。

抵抗を設定する場合には、PC moduleが接続されている必要があります。水、スクロース、グリセロール、ソルビトール、ポリエチレングリコールのような高抵抗（600Ω以上）のメディウムを使用する場合には、PC moduleの使用を推奨します。PC moduleはサンプルと並列な位置に置かれる抵抗器で、回路全体の抵抗を下げる効果があり、高抵抗なサンプルのタイムコンスタントを減少させることができます。

抵抗が無限大を示している場合、PC moduleの抵抗器は使用されていません。Gene Pulser Xcellの測定機能は、サンプルの抵抗値を測定することができます（§3.9参照）。

Exponential Decay Protocol Detail画面

```
PROTOCOL DETAIL:      EXPONENTIAL

  Voltage(V)                XXXX
  Capacitance(uF)           XXXX
  Resistance(ohm)           XXXX
  Cuvette(mm)                  X
```

図3.3　Exponential Decay Protocol Detail画面。この画面には減衰波の使用に必要な条件が表示されています。キュベット･サイズは必ずしも入力する必要はありません。記録としてのみ使用されます。

表3.1　減衰波使用時における電圧とコンデンサ容量の関係。

	コンデンサ容量（μF）	電圧（V）	
		サンプルの抵抗値＜600Ω	サンプルの抵抗値＞600Ω
高電圧回路	10－50	200－2500	200－3000
低電圧回路	25－3275	10－500	10－500

※　低電圧回路の使用には、CE moduleが必要です。

・上下の矢印キーを用いてコンデンサ容量、電圧、抵抗の各入力箇所を選択します。英数字キーにより数値を入力するか、左右の矢印キーで値を上下させ、任意の値を設定します。入力された値を変更するにはDeleteキーやClearキーを使用します。目的の値を入力した後、ENTERキーを押します。設定可能な範囲を外れる値に決定された場合、設定値は自動的に最も近い可能な値に変更されます。キュベット･サイズは必ずしも入力する必要はありません。記録としてのみ使用されます。
・必要な条件が入力されると、画面右下に“ P ”が点滅表示されます。この状態で、Gene Pulser Xcellは目的のパルスを供給することができます。

・PULSEボタンを押すと、パルスが供給されます。PULSEボタンを押すと画面には“ Pulsing ”の表示が現れます。パルス供給が終了するとブザーが鳴り、Protocol Results画面において供給されたパルスの情報を参照することができます（§3.3.5、図3.6を参照）。
・左右の矢印キーでProtocol Results画面とProtocol Detail画面の切り替えを行うことができます。
・Protocol Detail画面では、同じ条件のパルスを再度使用することができます。条件を変更する場合には、ENTERキーを押し、カーソルを表示させます。前述の方法で条件を変更します。使用した実験条件の保存方法は§3.3.6に記載されています。
・過去に使用したパルスの条件等を参照する方法は§3.8に記載されています。

3.3.3　タイムコンスタントを指定したエレクトロポレーション

減衰波を用いたエレクトロポレーションの原理については、§4.1に記載があります。Gene Pulser Xcellを用いてタイムコンスタントの指定された減衰波を供給するための方法は、以下に記載されています。

・Home画面（図3.2）で「２」を押すか、上下の矢印キーで“ Time constant protocol ”を選択します。ENTERキーを押すとTime Constant Protocol Detail画面（図3.4）が表示されます。
・このモードを使用する場合は、サンプルがGene Pulser Xcellにセットされている必要があります。以下の条件を入力します。
　　タイムコンスタント＋電圧

タイムコンスタントの指定されたエレクトロポレーションを行う場合、Gene Pulser Xcellは並列の抵抗を最大にし、コンデンサ容量を最小にします。これにより、サンプルに供給されるエネルギーは最大となります。このため、高電圧回路を使用する場合はPC moduleが必要となり、低電圧回路を使用する場合にはCE moduleとPC moduleの両方が必要となります。設定電圧は、使用する回路が高電圧回路であるか低電圧回路であるかを決定し、表3.2に示されているように、コンデンサ容量の範囲を限定します。電圧がどちらの回路も使用可能な値に設定されている場合、低電圧回路が優先的に使用されます。表3.2に示されているように、指定可能なタイムコンスタントはサンプルの抵抗値と使用される回路によって制限されています。

Gene Pulser Xcellはパルス供給の直前にサンプルの抵抗値を測定し、設定したタイムコンスタントと電圧の組み合わせで供給が可能かを判断します。設定されたタイムコンスタントが許容範囲より20%以上高い場合、使用可能なタイムコンスタントのおおよその値が示され、再度PULSEボタンを押すよう表示されます。推測されるサンプルの抵抗値については、§3.9に記載されています。

表3.2　サンプルの抵抗値によるタイムコンスタントの許容範囲。

サンプルの抵抗値（Ω）	タイムコンスタントの範囲（msec）	
	低電圧回路	高電圧回路
20	0.5－65.5	0.2－1.0
200	5.0－655	2.0－10
＞1000	25－3275	10－50

※　低電圧回路は10－500V、高電圧回路は200－3000Vで使用されます。

Time Constant Protocol Detail画面

```
PROTOCOL DETAIL:   TIME CONSTANT

 Voltage(V)                  XXXX
 Time constant(msec)       XXXX.X
 Cuvette(mm)                    X
```

図3.4 Time Constant Protocol Detail画面。この画面にはタイムコンスタントを指定した減衰波を供給するために必要な設定条件が表示されています。キュベット･サイズは必ずしも入力する必要はありません。記録としてのみ使用されます。

・上下の矢印キーを用いてタイムコンスタントや電圧の入力箇所を選択します。英数字キーにより数値を入力するか、左右の矢印キーで値を上下させ、任意の値を設定します。入力された値を変更するにはDeleteキーやClearキーを使用します。目的の値を入力した後、ENTERキーを押します。設定可能な範囲を外れる値に決定された場合、設定値は自動的に最も近い可能な値に変更されます。キュベット･サイズは必ずしも入力する必要はありません。記録としてのみ使用されます。
・必要な条件が入力されると、画面右下に“P”が点滅表示されます。この状態で、Gene Pulser Xcellは目的のパルスを供給することができます。
・ PULSEボタンを押すと、パルスが供給されます。PULSEボタンを押すと画面には“Pulsing”の表示が現れます。パルス供給が終了するとブザーが鳴り、Protocol Results画面において供給されたパルスの情報を参照することができます（§3.3.5、図3.7を参照）。
・左右の矢印キーでProtocol Results画面とProtocol Detail画面の切り替えを行うことができます。
・Protocol Detail画面では、同じ条件のパルスを再度使用することができます。条件を変更する場合には、ENTERキーを押し、カーソルを表示させます。前述の方法で条件を変更します。使用した条件の保存方法は§3.3.6に記載されています。
・過去に使用したパルスの条件等を参照する方法は§3.8に記載されています。

3.3.4 矩形波を用いたエレクトロポレーション

矩形波を用いたエレクトロポレーションの原理については、§4.2に記載があります。Gene Pulser Xcellを用いて矩形波を供給するための方法は、以下に記載されています。

・Home画面（図3.2）で「3」もしくは上下の矢印キーで“Square wave protocol”を選択し、ENTERキーを押すことでSquare Wave Protocol Detail画面（図3.5）が表示されます。
・以下の組み合わせの条件を入力することができます。
　パルス幅＋電圧
　パルス幅＋電圧＋パルス数＋パルス間隔

Square Wave Protocol Detail 画面

```
PROTOCOL DETAIL:    SQUARE WAVE

  Voltage(V)                 XXXX
  Pulse length(msec)       XXX.XX
  Number of pulses              1
  Pulse interval(sec)        00.0
  Cuvette(mm)                   X
```

図3.5 Square Wave Protocol Detail画面。この画面には矩形波の使用に必要な条件が表示されています。キュベット･サイズは必ずしも入力する必要はありません。記録としてのみ使用されます。

矩形波を使用したエレクトロポレーションでは、複数のパルスを連続して供給することができます。この条件は「パルス数（Number of pulses）」によって指定されます。個々のパルスの間隔は「パルス間隔（pulse interval）」によって指定されます。デフォルトではパルス数は１、パルス間隔は０です。複数のパルスを供給する場合はこれらの値を設定する必要があります。条件設定については§4.2に記載があります。

パルスの条件はどのような順序で入力することもできます。設定した電圧により、高電圧回路、低電圧回路のどちらを使用するのかが決定され、パルス数とパルス間隔は、表3.3に示されているような制限を受けます。これらの条件が許容範囲を超えて入力された場合、自動的に設定可能な最も近い値に変更されます。

表3.3　矩形波使用時における電圧とパルス数およびパルス間隔の関係。

	電圧（V）	パルス幅	パルス間隔	最大パルス数
高電圧回路	10−500	0.05−100ms	0.1−10s	10
低電圧回路	200−3000	0.05−5ms	5−30s	2

※　低電圧回路の使用には、CE moduleが必要です。

・上下の矢印キーを用いて電圧、パルス幅、パルス数、パルス間隔の各入力箇所を選択します。英数字キーにより数値を入力するか、左右の矢印キーで値を上下させ、任意の値を設定します。入力された値を変更するにはDeleteキーやClearキーを使用します。目的の値を入力した後、ENTERキーを押します。設定可能な範囲を外れる値に決定された場合、設定値は自動的に最も近い可能な値に変更されます。キュベット･サイズは必ずしも入力する必要はありません。記録としてのみ使用されます。
・必要な条件が入力されると、画面右下に“Ｐ”が点滅表示されます。この状態で、Gene Pulser Xcellは目的のパルスを供給することができます。
・PULSEボタンを押すと、パルスが供給されます。PULSEボタンを押すと画面には“Pulsing”の表示が現れます。パルス供給が終了するとブザーが鳴り、Protocol Results画面において供給されたパルスの情報を参照することができます（§3.3.5、図3.8を参照）。
・左右の矢印キーでProtocol Results画面とProtocol Detail画面の切り替えを行うことができます。
・Protocol Detail画面では、同じ条件のパルスを再度使用することができます。条件を変更する場合には、ENTERキーを押し、カーソルを表示させます。前述の方法で条件を変更します。
・使用した条件の保存方法は§3.3.6に記載されています。
・過去に使用したパルスの条件等を参照する方法は§3.8に記載されています。

3.3.5　Results画面

パルスの供給後、画面にはProtocol Results画面が表示されます。この画面には実験結果がグラフと表で表示されます。図3.6、3.7および3.8はそれぞれ減衰波、タイムコンスタントを指定した減衰波および矩形波の結果表示例です。

過去100回分の実験結果と実験条件は、Gene Pulser Xcellの内蔵メモリに自動的に保存され、Data Management機能（§3.8）から参照することができます。

Exponential Decay Protocol Results 画面

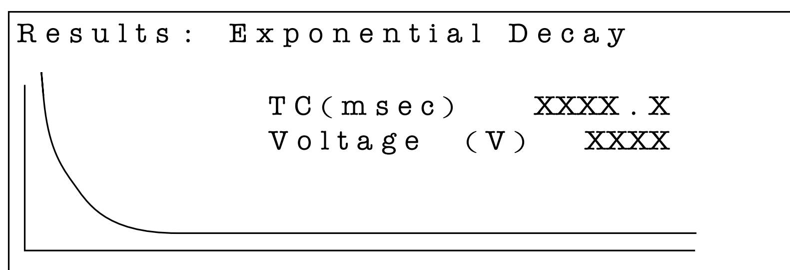


図3.6　Exponential Decay Protocol Results画面。グラフは減衰波を示します。表には算出されたタイムコンスタント（TC）の値と実効電圧（Voltage）が示されます。

Time Constant Protocol Results 画面

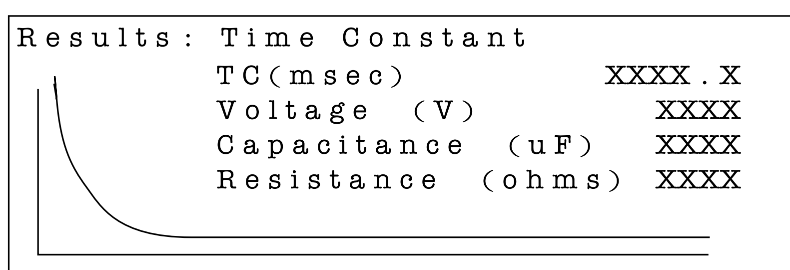


図3.7　Time Constant Protocol Results画面。グラフは減衰波を示します。表には実際のタイムコンスタント（TC）の値、実行電圧（Voltage）、使用されたコンデンサの容量（Capacitance）および抵抗値（Resistance）が示されます。

Square Wave Protocol Results 画面

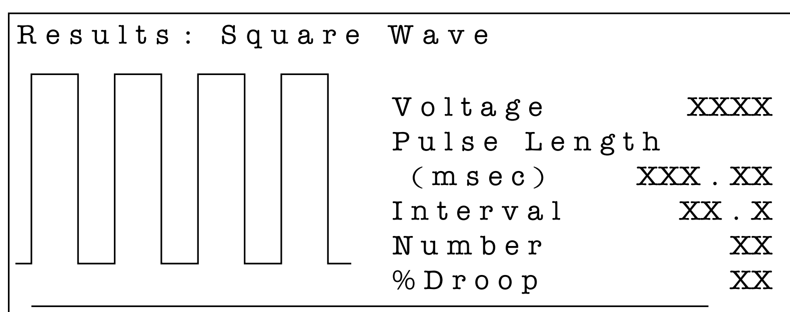


図3.8　Square Wave Protocol Results画面。グラフは矩形波を示しますが、横軸の拡張性はありません。表には実際のパルス幅（Pulse Length）、実行電圧（Voltage）、算出されたdroop（%Droop）および複数のパルスを供給した場合のパルス間隔（Interval）とパルス数（Number）が示されます。

3.3.6　マニュアル操作による実験条件の保存

マニュアル操作で作成されたプロトコールは、以下の方法でユーザー・プロトコールとして保存することができます。

・§3.3.2、3.3.3および3.3.4に記載されている方法で、プロトコールを作成します。
・Protocol Detail画面が表示されている状態でSaveボタンを押します。
・１つ目のUser Directory画面（図3.9）が表示されます。この画面の２行目には“ Choose location for protocol ”と表示されています。
・左右の矢印キーを用いて２つのUser Directory画面を切り替えます。数字キーか上下の矢印キーを用いて、プロトコールを保存するユーザー名を選択します。ENTERキーを押すと、User Protocols画面（図3.10）が表示されます。この画面の２行目には“ Choose location for protocol ”と表示されています。新たなユーザー名を作成する方法は§3.5.2に記載されています。
・左右の矢印キーを用いて２つのUser Protocols画面を切り替えます。数字キーか上下の矢印キーを用いて、プロトコールを保存する場所を選択します。プロトコールは何も保存されていない場所（§3.3.6A）もしくは別のプロトコールが保存されている場所（§3.3.6B）へ保存します。ユーザー・プロトコールを削除する方法は§3.5.5に記載されています。
・ENTERキーを押すと、Protocol Detail画面が再度表示されます。PULSEボタンを押すことで、サンプルにパルスを供給することができます。

User Directory画面

```
USER DIRECTORY
Choose location for protocol
   1. User1
   2. Labguy
   3. Malcom
   4. Smith
   5. Wesson
 > 6.
```

図3.9　User Directory画面。第１のUser Directory画面の例です。左右の矢印キーを使用することで、７～１２までのユーザー名が表示された第２の画面との切り替えを行うことができます。初期状態のUser Directory画面には番号のみ表示されていま

User Protocols画面

```
USER PROTOCOLS: User1
Choose location for protocol
   1. CHO
   2. Monkey
   3. Human
   4.
   5.
 > 6.
```

図3.10　User Protocols画面。第１のUser Protocols画面の例です。左右の矢印キーを使用することで、７～１２までのプロトコール名が表示された第２の画面との切り替えを行うことができます。初期状態のUser Protocols画面には番号のみ表示されています。

3.3.6A　新規に保存する場合

・User Protocols画面が表示されている状態で、１～12を押すか上下左右の矢印キーを用いて、何も保存されていない場所（図3.10の例では、４、５、６のいずれか）を選択します。
・ENTERキーを押し、場所を決定します。
・英数字キーを用いてプロトコール名を入力します（デフォルトではアルファベット入力になっていますが、SHIFTキーにより数字入力との切り替えを行うことができます。プロトコール名は最大10文字まで入力することができます。同じキーを続けて使用する場合は右矢印キーでカーソルを移動させます。スペースを入力することはできません）。Saveキーもしくは ENTERキーを押すと、プロトコールが指定した場所に保存されます。
・ENTERキーを押すと、Protocol Detail画面が再度表示されます。PULSEボタンを押すことで、サンプルにパルスを供給することができます。

3.3.6B　上書き保存する場合

・User Protocols画面が表示されている状態で、１～12を押すか上下左右の矢印キーを用いて、別のプロトコールが保存されている場所（図3.10の例では、１、２、３のいずれか）を選択します。
・ENTERキーを押し、場所を決定します。
・上書きをするか否かの警告メッセージ（図3.11）が表示されます。

警告画面：プロトコールの上書き

```
Do you want to overwrite the
protocol?
   YES                NO

Press BACK or ENTER to return
to the previous screen.
Press the LEFT arrow then
ENTER to overwrite the name.
```

図3.11　警告画面：プロトコールの上書き

・デフォルトでは“ NO ”が選択されています。上書きしない場合はENTERキーを押します。画面は直前のUser Protocols画面へ戻ります。
・左矢印キーを押し“ YES ”を選択した後ENTERキーを押すと、ファイルが上書きされます。新たに作成したユーザー･プロトコールは、これまで保存されていた名前で保存されます。画面は直前のUser Protocols画面へ戻り、カーソルは選択したプロトコールの番号上に表示されます。
・ENTERキーを押すと、Protocol Detail画面が再度表示されます。PULSEボタンを押すことで、サンプルにパルスを供給することができます。

3.4　プリセット･プロトコール

Gene Pulser Xcellには、広く使用されているいくつかの細菌、菌類、哺乳動物細胞への至適条件があらかじめ入力されています。これらの条件は表3.4に記載されており、§3.4.2に示されている方法で、画面上で参照することができます。パルス供給の前に、これらの条件を変更することもできます。条件の変更を直接上書き保存することはできませんが、ユーザー･プロトコールとして保存することはできます（§3.4.4を参照）。

3.4.1　プリセット･プロトコールを使用するためのクイックガイド

・Home画面で「４」を押し、次いでENTERキーを押すと、Pre-set Protocols画面が表示されます。
・１～３のキーを使用して細菌（Bacterial）、菌類（Fungal）、哺乳動物（Mammalian）のいずれかを選択します。ENTERキーを押すと、それぞれの生物名のリストが表示されます。細菌及び哺乳動物を選択した場合、左右の矢印キーを用いて２つの画面の切り替えを行うことができます。
・目的のプロトコールの番号を押し、次いでENTERキーを押すと、Protocol Detail画面が表示されます。
・PULSEボタンを押し、エレクトロポレーションを実行します。
・実験を続ける場合はBACKキーを押し、Protocol Detail画面に戻ります。

3.4.2　プリセット･プロトコールを用いたエレクトロポレーション

プリセット･プロトコールは細菌用に9種類、菌類用に6種類、哺乳動物用に12種類用意されています。これらのプロトコールは、それぞれの生物種に対してあらかじめ至適化されています。プリセット･プロトコールは下記の方法で使用します。

・Home画面で、「４」もしくは上下の矢印キーを用いて“ Pre-set Protocols ”を選択します。次いでENTERキーを押すと、Pre-set Protocols画面（図3.12）が表示されます。
・１～３のキーもしくは上下の矢印キーを使用して細菌（Bacterial）、菌類（Fungal）、哺乳動物（Mammalian）のいずれかを選択し、ENTERキーを押します。
・英数字キーもしくは上下の矢印キーで、目的の生物名をリストから選択します。細菌及び哺乳動物を選択した場合、左右の矢印キーを用いて２つの画面の切り替えを行うことができます。目的の生物名が選択されている状態でENTERキーを押すと、Protocol Detail画面が表示され、プロトコールの内容を参照することができます。画面右下に点滅表示される“ P ”は、パルス供給が可能であることを示します。
  ・例えば、Pre-set Protocols画面で「３」を押し“ Mammalian ”を選択します。次いでENTERキーを押すと、6種類の哺乳動物細胞名が記載された１つ目のPre-set Mammalian Protocols画面（図3.13）が表示されます。左右の矢印キーで２つのPre-set Mammalian Protocols画面の切り替えを行います。英数字キーもしくは上下の矢印キーを用いて、リスト内の細胞名を選択します。目的の細胞名を選択した後ENTERを押すと、Protocol Detail画面が表示され選択したプリセット･プロトコールの内容を参照することができます。Pre-set Mammalian Protocols画面の場合、「１」を選択すると2mmキュベットを用いたCHO用のProtocol Detail画面が表示されます。
・PULSEボタンを押すとパルスが供給され、画面には“ Pulsing ”の表示が現れます。パルス供給が終了するとブザーが鳴り、Protocol Results画面において供給されたパルスの情報を参照することができます（§3.3.5を参照）。
・左右の矢印キーでProtocol Results画面とProtocol Detail画面の切り替えを行うことができます。
・Protocol Detail画面では、同じ条件のパルスを再度使用することができます。条件を変更する場合には、ENTERキーを押し、カーソルを表示させます。前述の方法で条件を変更することができます。使用したプロトコールの保存方法は§3.4.3に記載されています。
・過去に使用したパルスの条件等を参照する方法は§3.8に記載されています。

Pre-set Protocols画面

```
ＰＲＥ－ＳＥＴ　ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ

　　　１．Ｂａｃｔｅｒｉａｌ
　　　２．Ｆｕｎｇａｌ
　　　３．Ｍａｍｍａｌｉａｎ
```

図3.12　Pre-set Protocols画面。細菌、菌類、哺乳動物細胞のためのプリセット･プロトコールが用意されています。この画面で目的の生物種を選択します。

哺乳動物用のPre-set Protocols画面（画面1）

```
ＰＲＥ－ＳＥＴ　ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ：　ＭＡＭＭＡＬＩＡＮ

　　　１．ＣＨＯ
　　　２．Ｃｏｓ７
　　　３．Ｍ３Ｔ３
　　　４．２９３
　　　５．ＨｅＬａ
>　　 ６．ＢＨＫ２１
```

哺乳動物用のPre-set Protocols画面（画面2）

```
ＰＲＥ－ＳＥＴ　ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ：　ＭＡＭＭＡＬＩＡＮ

　　　７．Ａ５４９
　　　８．ＣＶ１
　　　９．Ｋ５６２
　　１０．ＨＬ６０
　　１１．Ｊｕｒｋａｔ
<　 １２．ＨｕＴ７８
```

図3.13　哺乳動物用のPre-set Protocols画面。12種類の細胞へのプロトコールが用意されています。リストでは、２つの画面に６種類ずつの細胞名が表示されます。

CHOへのプリセット･プロトコールが示されたProtocol Detail画面

```
ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ　ＤＥＴＡＩＬ：　ＣＨＯ

　　Ｖｏｌｔａｇｅ（Ｖ）　　　　　　　　　　160
　　Ｐｕｌｓｅ　Ｌｅｎｇｔｈ（ｍｓｅｃ）　15.00
　　Ｎｕｍｂｅｒ　ｏｆ　ｐｕｌｓｅｓ　　　　　1
　　Ｐｕｌｓｅ　ｉｎｔｅｒｖａｌ（ｓｅｃ）　00.0
　　Ｃｕｖｅｔｔｅ（ｍｍ）　　　　　　　　　　2
　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　P
```

図3.14　CHOへのプリセット･プロトコールが示されたProtocol Detail画面。

表3.4　Gene Pulser Xcellのプリセット・プロトコール機能に含まれる至適化されたプロトコール。

プリセット・プロトコール	細胞名	波形	パルス幅 (msec)	コンデンサ容量 (μF)	抵抗 (Ω)	電圧 (V)	キュベット (cm)	サンプル容量 (μl)	
Mammalian 1	CHO	Square wave	15			160	0.2	100	
Mammalian 2	COS7	Square wave	20			110	0.2	100	
Mammalian 3	3T3	Exponential decay		500	∞	160	0.2	100	
Mammalian 4	293	Square wave	25			110	0.2	100	
Mammalian 5	HeLa	Exponential decay		500	∞	160	0.2	100	
Mammalian 6	BHK21	Square wave	25			140	0.2	100	
Mammalian 7	A549	Square wave	10			150	0.2	100	
Mammalian 8	CV1	Square wave	25			100	0.2	100	
Mammalian 9	K562	Exponential decay		1000	∞	155	0.2	100	
Mammalian 10	HL60	Square wave	25			140	0.2	100	
Mammalian 11	Jurkat	Exponential decay		1000	∞	140	0.2	100	
Mammalian 12	HuT78	Square wave	25			130	0.2	100	
Bacterial 1	E.coli	Exponential decay		25	200	1800	0.1	20	
Bacterial 2	E.coli	Exponential decay		25	200	2500	0.2	20-40	
Bacterial 3	E.coli	Exponential decay		25	200	3000	0.2	20-40	
Bacterial 4	A.tumefaciens	Exponential decay		25	200	2400	0.1	20	
Bacterial 5	P.aeruginosa	Exponential decay		25	200	2500	0.2	100	
Bacterial 6	S.aureus	Exponential decay		25	100	2900	0.2	50	
Bacterial 7	B.cereus	Exponential decay		50	200	1000	0.2	100	
Bacterial 8	S.pyogenes	Exponential decay		25	200	2100	0.2	200	
Bacterial 9	L.plantarum	Exponential decay		25	400	1500	0.2	40	
Fungal 1	S.cerevisiae	Exponential decay		25	200	1500	0.2	40	
Fungal 2	S.cerevisiae	Exponential decay		25	200	2500	0.4	80	
Fungal 3	S.pombe	Exponential decay		25	200	2300	0.2	40	
Fungal 4	C.albicans	Exponential decay		25	200	1500	0.2	40	
Fungal 5	P.pastoris	Exponential decay		25	200	2000	0.2	40	
Fungal 6	D.discoideum	Square wave	1.0			1000	0.4	800	2 pulses (5 sec int)

3.4.3　プリセット･プロトコールの修正

プリセット･プロトコールは、下記の手順で修正することができます。

・Protocol Detail画面で上下の矢印キーを用いて修正する項目を選択します。減衰波では電圧、コンデンサ容量、抵抗、矩形波ではパルス幅、電圧、パルス数、パルス間隔を変更することができます。（注意：プリセット･プロトコールの波形は直接変更することはできません。）目的の項目を選択した後、英数字キーを用いて新たな値を入力します。左右の矢印キーを用いて新たな値を入力することもできます。入力した値を訂正する場合は、DeleteキーやClearキーを使用します。適切な値を入力した後、ENTERキーを押します。設定可能な範囲を外れる値が入力された場合、設定値は自動的に範囲内の最も近い値に変更されます。修正する項目が複数の場合は、上下の矢印キーを用いて他の値を選択し、同様に入力します。
・必要な条件が入力されると、画面右下に“ P ”が点滅表示されます。この状態で、Gene Pulser Xcellは目的のパルスを供給することができます。
・PULSEボタンを押すと、パルスが供給されます。PULSEボタンを押すと画面には“ Pulsing ”の表示が現れます。パルス供給が終了するとブザーが鳴り、Protocol Results画面において供給されたパルスの情報を参照することができます。
・BACKキーもしくは左矢印キーを押すと直前のProtocol Detail画面へ戻ることができます。この状態で、同じ条件のパルスを再度使用することができます。右矢印キーを押すと、再度Protocol Results画面が表示されます。（注意：表示されるProtocol Detail画面には修正後の数値が記載されています。修正前のプリセット･プロトコールを参照する場合は、再度BACKキーを押します。）
・条件を変更する場合には、ENTERキーを押し、カーソルを表示させます。前述の方法で条件を変更します。
・過去に使用したパルスの条件等を参照する方法は§3.8に記載されています。

3.4.4　修正したプリセット･プロトコールの保存

修正したプリセット･プロトコールは、以下の方法にしたがってユーザー･プロトコールとして保存することができます。

・§3.4.3の手順でプリセット･プロトコールを修正します。
・Protocol Detail画面が表示されている状態で、Saveボタンを押します。
・１つ目のUser Directory画面（図3.9）が表示されます。この画面の２行目には“ Choose location for protocol ”と表示されています。
・左右の矢印キーを用いて２つのUser Directory画面を切り替えます。数字キーか上下の矢印キーを用いて、プロトコールを保存するユーザー名を選択します。ENTERキーを押すと、User Protocols画面（図3.10）が表示されます。この画面の２行目には“ Choose location for protocol ”と表示されています。新たなユーザー名を作成する方法は§3.5.2に記載されています。
・左右の矢印キーを用いて２つのUser Protocols画面を切り替えます。数字キーか上下の矢印キーを用いて、プロトコールを保存する場所を選択します。プロトコールは何も保存されていない場所（§3.3.6A）もしくは別のプロトコールが保存されている場所（§3.3.6B）へ保存します。ユーザー･プロトコールを削除する方法は§3.5.5に記載されています。
・保存したプロトコールを使用する場合は、ENTERキーを押しProtocol Detail画面を表示させます。PULSEボタンを押すとパルスを供給することができます。

3.5　ユーザー･プロトコール

ユーザー･プロトコール機能は、作成したプロトコールをGene Pulser Xcellに保存する機能です。最大で144件（12ユーザー名×12プロトコール）のプロトコールを保存することができます。

新たなプロトコールを作成する方法は、以下に記載があります。

・マニュアル操作で新規にプロトコールを作成する場合は、§3.3.2、3.3.3および3.3.4を参照します。
・プリセット･プロトコールを修正する場合は§3.4.3を参照します。
・ユーザー･プロトコールとして新たに作成する場合は§3.5.3を参照します。
・既に保存されているユーザー･プロトコールを修正する場合は§3.5.4を参照します。

作成、修正したプロトコールを保存せずに使用することもできます（§3.5.4を参照）。

3.5.1　ユーザー･プロトコールを使用するためのクイックガイド

・Home画面で「５」を押し、次いでENTERキーを押すと、User Directory画面が表示されます。左右の矢印キーで、２つのUser Directory画面を切り替えることができます。
・数字キーで目的のユーザー名を選択し、ENTERキーを押しと、User Protocols画面が表示されます。左右の矢印キーで、２つのUser Protocols画面を切り替えることができます。
・PULSEボタンを押すと、サンプルへパルスが供給されます。
・BACKキーを押すと、直前のProtocol Detail画面が表示されます。この状態で次のパルスを供給することができます。

3.5.2　ユーザー名の新規作成

ユーザー名が登録されていないディレクトリ（図3.15）には、新たにユーザー名を設定することができます。ユーザー名やユーザー･プロトコールの削除方法は§3.5.5に記載されています。

以下の手順で新たなユーザー名を作成します。

・Home画面（図3.2）で「５」を押し、次いでENTERキーを押すと、User Directory画面（図3.15）が表示されます。
・左右の矢印キーで、２つのUser Directory画面を切り替えることができます。数字キーもしくは上下の矢印キーを用いて、ユーザー名が登録されていないディレクトリを選択します。ENTERキーを押します。
・英数字キーを使用してユーザー名を入力します。ユーザー名は最大10文字まで入力することができます。入力後、Saveキーを押し、新たなユーザー名を保存します。

3.5.3　ユーザー･プロトコールの新規作成

ここには、User Protocols画面で新たなユーザー･プロトコールを作成し、保存する方法が記載されています。新たなユーザー･プロトコールはUser Protocols画面（図3.16）の空いている場所に保存することができます。§3.5.4には保存してあるユーザー･プロトコールを修正し、保存する方法が記載されています。

・以下の方法で、Home画面（図3.2）からUser Protocols画面に入ります。
- 「５」もしくは上下の矢印キーで“ User Protocols ”を選択し、ENTERキーを押します。User Directory画面（図3.15）が表示されます。
- 左右の矢印キーを用いて２つのUser Directory画面の切り替えを行います。数字キーもしくは左右の矢印キーを使用して目的のユーザー名を選択します。
- ENTERキーを押すと、User Protocols画面（図3.16）が表示されます。
- 数字キーもしくは矢印キーを用いて、ユーザー・プロトコールが保存されていない場所を選択します。必要に応じて§3.5.5の手順で不要なユーザー・プロトコールを削除します。ENTERキーを押すとSelect Method画面（図3.17）が表示されます。
- 数字キーもしくは矢印キーを用いて減衰波（Exponential protocol）、タイムコンスタントを指定した減衰波（Time constant protocol）もしくは矩形波（Square wave protocol）を選択します。ENTERキーを押すと、Protocol Detail画面が表示されます。

User Directory画面（画面1）

```
USER DIRECTORY

    1.User1
    2.Labguy
    3.Malcom
    4.Smith
    5.Wesson
   >6.
```

User Directory画面（画面2）

```
USER DIRECTORY

   < 7.
     8.
     9.
    10.
    11.
    12.
```

図3.15　User Directory画面

User Protocols画面

```
USER PROTOCOLS: User1

    1.CHO
    2.Monkey
    3.Human
    4.
    5.
   >6.
```

図3.16　User Protocols画面

Select Method画面

```
ＳＥＬＥＣＴ ＭＥＴＨＯＤ

  １．Ｅｘｐｏｎｅｎｔｉａｌ ｐｒｏｔｏｃｏｌ
  ２．Ｔｉｍｅ ｃｏｎｓｔａｎｔ ｐｒｏｔｏｃｏｌ
  ３．Ｓｑｕａｒｅ ｗａｖｅ ｐｒｏｔｏｃｏｌ
```

図3.17　Select Method画面

・“ Exponential protocol ” を選択した場合、Exponential Decay Protocol Detail画面（図3.18）が表示されます。この画面の１行目には、ユーザー名が表示されます。

Exponential Decay Protocol Detail画面

```
Ｌａｂｇｕｙ：        Ｐｒｏｔｏｃｏｌ：

  Ｖｏｌｔａｇｅ（Ｖ）              ＸＸＸＸ
  Ｃａｐａｃｉｔａｎｃｅ（ｕＦ）    ＸＸＸＸ
  Ｒｅｓｉｓｔａｎｃｅ（ｏｈｍ）    ＸＸＸＸ
  Ｃｕｖｅｔｔｅ（ｍｍ）               Ｘ
```

図3.18　Exponential Decay Protocol Detail画面

・“ Time constant protocol ” を選択した場合、Time Constant Protocol Detail画面（図3.19）が表示されます。この画面の１行目には、ユーザー名が表示されます。

Time Constant Protocol Detail画面

```
Ｌａｂｇｕｙ：        Ｐｒｏｔｏｃｏｌ：

  Ｖｏｌｔａｇｅ（Ｖ）              ＸＸＸＸ
  Ｔｉｍｅ ｃｏｎｓｔａｎｔ（ｍｓｅｃ）ＸＸＸＸ．Ｘ
  Ｃｕｖｅｔｔｅ（ｍｍ）               Ｘ
```

図3.19　Time Constant Protocol Detail画面

・“ Square wave protocol ” を選択した場合、Square Wave Protocol Detail画面（図3.20）が表示されます。この画面の１行目には、ユーザー名が表示されます。

Square Wave Protocol Detail画面

```
Labguy:          Protocol:

   Voltage (V)                  XXXX
   Pulse length (msec)         XXX.X
   Number of pulses                1
   Pulse interval (sec)         00.0
   Cuvette (mm)                    X
```

図3.20　Square Wave Protocol Detail画面

・上下の矢印キーを用いて必要な項目を選択します。英数字キーもしくは左右の矢印キーで数値を入力します。入力した値を訂正する場合は、DeleteキーやClearキーを使用します。適切な値を入力した後、ENTERキーを押します。設定可能な範囲を外れる値が入力された場合、設定値は自動的に最も近い適切な値（表3.1、3.2、3.3を参照）に変更されます。キュベット･サイズは必ずしも入力する必要はありません。記録としてのみ使用されます。
・必要な条件が入力されると、画面右下に“ P ”が点滅表示されます。この状態で、Gene Pulser Xcellは目的のパルスを供給することができます。
・PULSEボタンを押すと、パルスが供給されます。PULSEボタンを押すと画面には“ Pulsing ”の表示が現れます。パルス供給が終了するとブザーが鳴り、Protocol Results画面において供給されたパルスの情報を参照することができます（§3.3.5を参照）。
・Protocol Detail画面でSaveを押します。
・User Protocols画面が表示されます。このとき、選択した場所にカーソルが点滅しています。英数字キーを用いてプロトコール名を入力します。デフォルトではアルファベットが入力されます。SHIFTを用いて数字とアルファベットの切り替えを行います。プロトコール名入力後、SaveキーもしくはENTERキーを押すと、作成したプロトコールは指定した場所に保存されます。

3.5.4　ユーザー･プロトコールの修正

以下の手順でユーザー･プロトコールを修正します。

・以下の方法で、Home画面（図3.2）からUser Protocols画面に入ります。
  ・「５」もしくは上下の矢印キーで“ User Protocols ”を選択し、ENTERキーを押します。User Directory画面
  （図3.15）が表示されます。
  ・左右の矢印キーを用いて２つのUser Directory画面の切り替えを行います。数字キーもしくは上下の矢印キーを使用して目的のユーザー名を選択します。ENTERキーを押すと、User Protocols画面（図3.16）が表示されます。
・数字キーもしくは矢印キーを用いて、修正するユーザー･プロトコールを選択します。ENTERキーを押すとProtocol Detail画面が表示されます。
・上下の矢印キーを用いて修正する項目を選択します。英数字キーもしくは左右の矢印キーを使用して新たな数値を入力します。DeleteキーやClearキーを使用します。
・必要な値を入力した後、ENTERキーを押します。設定可能な範囲を外れる値が入力された場合、設定値は自動的に最も近い適切な値に変更されます。
・他の修正が必要な項目についても同様に操作します。Protocol Detail画面において必要な値がすべて入力されると、PULSEボタンが使用可能になります。修正されたプロトコールは、保存せずに使用することができます。

・Protocol Detail画面でSaveボタンを押すと、修正後のプロトコールを保存することができます。プロトコールの上書きを確認する旨の警告メッセージ(図3.21) が表示されます。デフォルトでは“NO”が選択されています。
・上書きを行わない場合、BACKキーを押してProtocol Detail画面に戻ります。ENTERキーを押してUser Directory画面（図3.9）に戻り、新たな場所を選択します。プロトコールを保存する場所の選択については§3.3.6に記載があります。
・上書きを行う場合は、左矢印キーを用いて“YES”を選択し、ENTERキーを押します。新たなユーザー･プロトコールがこれまで保存されていたプロトコール名で保存されます。User Protocols画面が表示されます。

警告画面：プロトコールの上書き

```
Do you want to overwrite the
protocol?
   YES                 NO

Press BACK or ENTER to return
to the previous screen.
Press the LEFT arrow then
ENTER to overwrite the name.
```

図3.21　警告画面：プロトコールの上書き

3.5.5　ユーザー名、ユーザー･プロトコールの削除

ユーザー名を削除する場合は、事前に、含まれているユーザー･プロトコールを全て削除する必要があります。

以下の手順でユーザー･プロトコールを削除します。

・以下の方法で、Home画面（図3.2）からUser Protocols画面に入ります。
　・「5」もしくは上下の矢印キーで“User Protocols”を選択し、ENTERキーを押します。User Directory画面（図3.15）が表示されます。左右の矢印キーを用いて２つのUser Directory画面の切り替えを行います。
　・数字キーもしくは上下の矢印キーを使用して目的のユーザー名を選択します。
　・ENTERキーを押すと、User Protocols画面が表示されます。
・数字キーもしくは上下の矢印キーを用いて、削除するユーザー･プロトコールを選択します。
・Deleteキーを押すと、選択されているユーザー･プロトコールを削除するか否かの警告が表示されます。デフォルトでは“NO”が選択されています。
　・プロトコールを削除しない場合は、BACKキーもしくはENETRキーを押し、直前のUser Protocols画面に戻ります。
　・削除する場合は、左の矢印キーを押し“YES”を選択し、ENTERキーを押します。保存されていたユーザー･プロトコールの内容と名前は全て削除されます。再度User Protocols画面が表示されます。

警告画面：プロトコールの削除

```
Do you want to delete the
protocol?

   YES                 NO
Press BACK or ENTER to return
to the previous screen.
Press the LEFT arrow then
ENTER to delete the name.
```

図3.22　警告画面：プロトコールの削除

ユーザー名の削除は、下記の手順で行います。

・User Directory画面で上下の矢印キーもしくは数字キーを用い、削除するユーザー名を選択します。左右の矢印キーを用いて２つのUser Directory画面の切り替えを行います。
・Deleteキーを押します。選択したユーザー・ディレクトリにユーザー・プロトコールが含まれていない場合、選択されているユーザー名を削除するか否かの警告（図3.23）が表示されます。デフォルトでは“ NO ”が選択されています。
  ・削除を行わない場合は、ENTERキーを押します。再度、User Directory画面が表示されます。
  ・削除を実行する場合は、左矢印キーを用いて“ YES ”を選択し、ENTERを押します。選択したユーザー名の削除されたUser Directory画面が表示されます。
・選択したユーザー・ディレクトリにユーザー・プロトコールが含まれている場合、“ All User Protocols under this name must be deleted before this user name can be deleted. ”というメッセージが表示されます。上記の手順にしたがってユーザー・プロトコールを削除します。

警告画面：ユーザー名の削除

```
Do you want to delete the user
protocol?

   YES               NO
Press BACK or ENTER to return
to the previous screen.
Press the LEFT arrow then
ENTER to delete the name.
```

図3.23　警告画面：ユーザー名の削除

3.5.6　ユーザー名、ユーザー・プロトコール名の変更

以下の手順で、ユーザー名、ユーザー・プロトコール名を変更します。

・変更するユーザー名もしくはユーザー・プロトコール名をUser Directory画面もしくはUser Protocols画面から選択します。
・Clearキーを押すと、名称を変更するか否かの警告（図3.24）が表示されます。デフォルトでは“ NO ”が選択されています。
・名称を変更しない場合はENTERキーを押します。User Directory画面もしくはUser Protocols画面が再度表示されます。
・名称を変更する場合は、左矢印キーを押して“ YES ”を選択しENTERキーを押します。選択した場所が空欄になった直前の画面が表示されます。英数字キーを用いて新たな名称を入力します。名称は最大10文字まで入力することができます。SHIFTキーを用いてアルファベットと数字の切り替えを行います。Saveキーを押すと、新たな名称が保存されます。

警告画面：名称変更

```
Do you want to delete the user
protocol?

   YES               NO
Press BACK or ENTER to return
to the previous screen.
Press the LEFT arrow then
ENTER to change the name.
```

図3.24　警告画面：名称変更

3.6　ラスト・パルス機能

Home画面（図3.2）で「６」を押すか、上下の矢印キーを用いて“ Last pulse ”を選択します。ENTERキーを押すと、直前に使用したパルスのProtocol Detail画面が表示されます。この機能は、一旦、装置の電源を落としてしまった後でも使用することができます。

3.7　実験条件の至適化

至適化支援機能により、左右の矢印キーを用いて、パルスの電圧を一定量ずつ変更することができます。操作方法はマニュアル操作（§3.3.2、3.3.3および3.3.4）とほぼ同じですが、電圧の増減量を設定する必要があります。

・Home画面（図3.2）で「７」を押すか、上下の矢印キーを用いて“ Optimize ”を選択します。ENTERキーを押すと、Select Method画面（図3.17）が表示されます。
・数字キーもしくは矢印キーを用いて減衰波（Exponential protocol）、タイムコンスタントを指定した減衰波（Time constant protocol）もしくは矩形波（Square wave protocol）を選択します。ENTERキーを押すと、Optimize画面が表示されます。

Select Method画面

```
SELECT METHOD

    1.Exponential protocol
    2.Time constant protocol
    3.Square wave protocol
```

図3.17　Select Method画面

・“ Exponential protocol ”を選択した場合は、Exponential Decay Protocol Optimize画面（図3.25）が表示されます。
・“ Time constant protocol ”を選択した場合は、Time Constant Protocol Optimize画面（図3.26）が表示されます。

Exponential Decay Protocol Optimize画面

```
OPTIMIZE: EXPONENTIAL DECAY

    Starting voltage (V)        XXXX
    Increment (V)                XXX
    Capacitance (uF)            XXXX
    Resistance (OHM)            XXXX
    Cuvette (mm)                   X
```

図3.25　Exponential Decay Protocol Optimize画面

Time Constant Protocol Optimize画面

```
OPTIMIZE: TIME CONSTANT

Starting voltage (V)          XXXX
Increment (V)                  XXX
Time const (msec)           XXXX.X
Cuvette (mm)                     X
```

図3.26　Time Constant Protocol Optimize画面

Square Wave Protocol Optimize画面

```
OPTIMIZE: SQUARE WAVE

Starting voltage (V)          XXXX
Increment (V)                  XXX
Pulse length (msec)          XXX.X
Number of pulses                 1
Pulse interval (sec)          XX.X
Cuvette (mm)                     X
```

図3.27　Square Wave Protocol Optimize画面

・上下の矢印キーを用いて、入力する項目を選択します。英数字キーもしくは左右の矢印キーを用いて必要な値を入力します。入力された値を変更する場合はDeleteキーやClearキーを使用します。目的の値を入力した後、ENTERキーを押します。設定可能な範囲を外れる値が入力されていた場合、設定値は自動的に最も近い可能な値に変更されます。
・必要な条件が入力されると、画面右下に“P”が点滅表示されます。この状態で、Gene Pulser Xcellは目的のパルスを供給することができます。
・作成したプロトコールは、以下の手順で使用します。
　・PULSEボタンを押すと、指定した電圧のパルスが供給されます。
　・パルス供給の終了するとProtocol Results画面が表示されます。左右の矢印キーでProtocol Results画面とProtocol Detail画面の切り替えを行うことができます。
　・Protocol Detail画面で再度PULSEボタンを押すと、同じ電圧のパルスを続けて供給することができます。ENTERキーを押すと、電圧の欄にカーソルが表示されます。左右の矢印キーを押すと、電圧を設定した割合で増減させることができます。PULSEボタンを押すと、新たなパルスが供給されます。

3.8　データ管理

データ管理機能を使用すると、過去100件分の実験条件と結果を参照することができます。個々のパルスのデータは、後述のように、１つの画面に示されます。個々のデータには、日付と時間、パルスの種類、設定された条件、実効値が含まれます。データは時間軸にしたがって保存されており、日付と時間をもとに呼び出すことができます。§3.10の記載にしたがって、装置の日付、時刻が正しいことを確認する必要があります。“Chronological order”を選択した場合は、古いデータから順に表示されます。“Reverse Chronological order”を選択した場合は、新

しいデータから順に表示されます。日付を特定した場合は、その日付を起点に表示されます。表示されるデータの内容を変更することはできません。

・Home画面（図3.2）で「８」を押すか、上下の矢印キーを用いて“ Data Management ”を選択します。ENTERキーを押すと、Data Management画面（図3.28）が表示されます。
・「１」～「４」の数字キーで、参照方法を選択します。「３」、「４」を選択した場合はDate画面（図3.29）が表示されます。数字キーを用いて日付を特定し、ENTERキーを押すと、目的の日付のデータを参照することができます。特定した日付のデータが保存されていない場合は、データが存在しない旨のメッセージが表示されます。

Data Management画面

```
What data do you want to view?
ALL data
 1.Reverse chronological order
 2.Chronological order

Data from a specific date
 3.Chronological order
 4.Reverse chronological order
```

図3.28　Data Management画面

Date画面

```
From what date do you want
to view data?

 Month  MM
 Date   DD
 Year   YY
```

図3.29　Date画面

注意：上記は時間の表示がデフォルト設定（MM/DD/YY）の場合です。表示方法をDD/MM/YYに変更した場合は、日、月、年に順に表示されます。

・左右の矢印キーを用いて参照するデータを切り替えます。BACKキーを押すとData Management画面へ戻ることができます。

Data output画面には、以下の内容が表示されます。

１行目：日付と時間
２行目：プロトコールの種類（マニュアル、プリセット、ユーザー）
３行目：パルスの種類
４～８行目：実験条件と結果

以下はData output画面の例です。Data output画面では内容を変更することはできません。

Data output画面（User Protocol,Square Wave）

```
Data output   12-12-01   20:20
User 11   Protocol 11
             Settings     Output
V              1230         1230
PL  (msec)  123.00       123.00
#P               12           12
PI  (sec)      12.3         12.3
%droop           12           12
```

Data output画面（Manual Mode,Exponential Decay）

```
Data output   12-12-01   20:21
Manual exponential
             Settings     Output
V              1230         1230
C (uF)         1230         1230
R (OHM)        1000         1000
TC (msec)                  111.1
Cuvette(mm)       1
```

Data output画面（Manual Mode,Time Constant）

```
Data output   12-12-01   20:22
Manual exponential

             Settings     Output
V              1230         1230
TC (msec)    1234.5       1234.5
Cuvette(mm)       1
```

Data output画面（Standard Protocol,S.pombe setting）

```
Data output   12-12-01   20:23
Sed Protocol: S.pombe

             Settings     Output
V              2000         2047
C (uF)           25           25
R (ohm)         200          200
TC (msec)                    5.1
Cuvette(mm)       2            2
```

図3.30　Data output画面の例

3.9　測定機能

測定機能を使用すると、パルスを供給する前にサンプルの抵抗値を測定することができます。また、CE module のコンデンサ容量を測定することもできます。

・Home画面（図3.2）で「９」を押すか、上下の矢印キーを用いて " Measurements " を選択します。ENTERキーを押すと、Measurements画面（図3.31）が表示されます。

Measurements画面

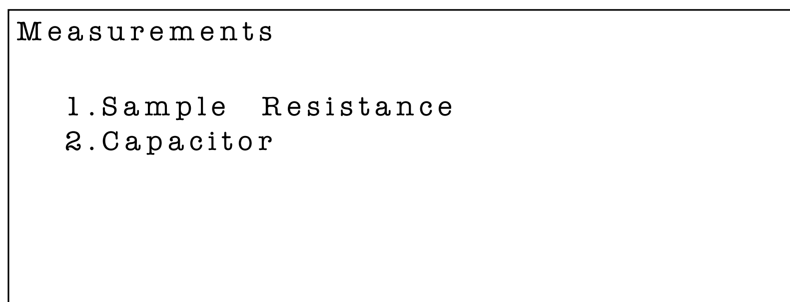


図3.31　Measurements画面

3.9.1　サンプル抵抗値の測定

サンプル抵抗値を測定する場合は、サンプルの入ったキュベットをShockPodに設置します。測定範囲は5～1100Ωです。サンプルの抵抗値が5Ω以下の場合は " 5 ohms " と表示されます。サンプルの抵抗値が1100Ω以上の場合は " ＞1100 ohms " と表示されます。

・Measurements画面（図3.31）で、数字キーもしくは上下の矢印キーを用いて " Sample Resistance " を選択し、ENTERキーを押します。Sample Resistance画面（図3.32）が表示されます。

Sample Resistance画面

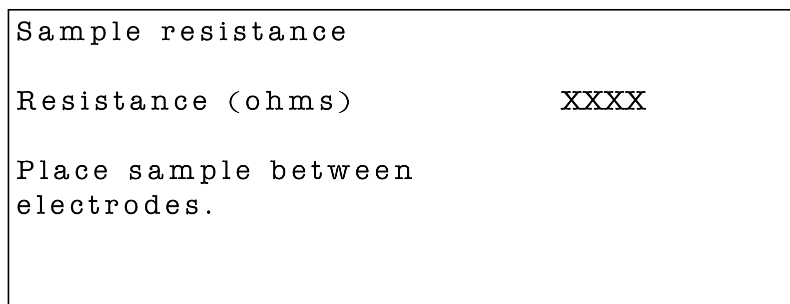


図3.32 Sample Resistance画面

・サンプルの入ったキュベットをShockPodに設置します。ShockPodの蓋を閉じ、ENTERキーを押します。測定されたサンプルの抵抗値が表示されます。測定範囲は5～1100Ωです。

3.9.2　コンデンサ容量の測定と校正（CE module）

電解コンデンサは経時的に容量が変化します。装置本来の性能を保つために、1〜3ヶ月に一度もしくは必要に応じてコンデンサの校正を行う必要があります。コンデンサ容量の測定機能を使用することで、より正確なコンデンサ容量で実験を行うことができます。以下の方法でコンデンサ容量の測定と校正を行います。

・Gene Pulser Xcell main unitからShockPodを外し、CE moduleを接続します。
・Measurements画面で、数字キーもしくは上下の矢印キーを用いて“ Capacitor ”を選択し、ENTERキーを押します。Capacitor Measurement画面（図3.33）が表示されます。
・英数字キーの小数点（. ）を押すと、Gene Pulser Xcell main unitおよびCE moduleのコンデンサ容量の校正が行われます。校正には２分程度を要します。試験が終了すると、画面の下に12個の数値が表示されます。上段および下段の左側３つの数値はCE moduleのコンデンサ容量を示します。これらのコンデンサは、減衰波を使用する際に組み合わせて用いられます。低電圧回路を用いて矩形波を供給する場合は、CE moduleの全てのコンデンサが使用されます。高電圧回路を用いて矩形波を供給する場合は、Gene Pulser Xcell main unitの50μFのコンデンサが使用されます。
・特定のコンデンサ容量を測定することもできます。Capacitor Measurement画面で英数字キーや左右の矢印キーを用い、測定する値を入力します。ENTERキーに次いでPULSEボタンを押します。“ Measured capacitance ”の欄に実際のコンデンサ容量が表示されます。この機能を使用する場合、サンプルは設置しません。実際にはパルスは供給されません。

Capacitor Measurement画面

```
Capacitor measurement

Capacitance (uF)                  XXXX

Measured capacitance (uF)         XXXX
```

図3.33　Capacitor Measurement画面

3.10　ユーザー･プリファレンス

・Home画面（図3.2）で「10」を押すか、上下の矢印キーを用いて“ User preferences ”を選択します。ENTERキーを押すと、User Preferences画面（図3.34）が表示されます。

User Preferences画面

```
User Preferences

   1.Clock
   2.Screen intensity
   3.Sleep function
```

図3.34　User Preferences画面

3.10.1　日時の設定

現在の日付と時刻を設定知ることができます。日付は、デフォルトでは月／日／年の順ですが、日／月／年に変更することもできます。時計は24時間制です。

・User Preferences画面（図3.34）で、数字キーもしくは上下の矢印キーを用いて“ Clock ”を選択します。ENTERキーを押すと、Set Clock画面（図3.35）が表示されます。

Set Clock画面

```
Set clock

PREFERENCE      MM/DD/YY    DD/MM/YY

DATE            XX/XX/XX    XX/XX/XX

TIME            XX:XX
```

図3.35　Set Clock画面

注意：デフォルトはMM/DD/YYです。

・左右の矢印キーを用いてMM/DD/YYとDD/MM/YYの切り替えを行います。ENTERキーを押すと選択した内容が決定され、カーソルは次の行に移ります。
・日付を変更しない場合は、再度ENTERキーを押します。変更する場合は、数字キーを用いて日付を入力します。「０」は１桁の数字（１～９）を入力する際に使用します。入力した値を変更する場合は、Deleteキーもしくは Clearキーを使用します。入力が終了した後、ENTERキーを押すと、カーソルは時間設定の欄に移ります。
・時間を変更しない場合はSaveキーを押します。変更する場合は、数字キーを用いて時間を入力します。時計は24時間制です。入力が終了した後、Saveキーを押すと、User Preferences画面に戻ります。

3.10.2　画面の輝度調整

・User Preferences画面で、数字キーもしくは上下の矢印キーを用いて“ Screen intensity ”を選択します。ENTERキーを押すと、LCD Brightness画面（図3.36）が表示されます。

LCD Brightness画面

```
LCD BRIGHTNESS

Press UP/DOWN arrow keys
to change the brightness of
the LCD display.
Press ENTER to select.
```

図3.36　LCD Brightness画面

・上下の矢印キーで画面の輝度を変更します。
・ENTERキーを押すと、User Preferences画面へ戻ることができます。

3.10.3 スリープ機能の設定

スリープ機能は、余分なエネルギーの消費を抑えるための機能で、バッテリーや液晶画面の耐用期間を延ばす効果があります。デフォルトでは、30分間操作されない状態が続くと、液晶画面はスリープ･モードに入ります。いずれかの英数字キーを押すと、スリープ･モードに入る前の画面が再び表示され、操作を続けることができます。スリープ機能が作動するまでの時間を変更することができます。

・User Preferences画面で、数字キーもしくは上下の矢印キーを用いて“ Sleep function ”を選択します。
ENTERキーを押すと、Sleep Function画面（図3.37）が表示されます。

Sleep Function画面

```
SLEEP FUNCTION

Time before entering sleep
mode (min):

  5   10   20   30   60   OFF
```

図3.37　Sleep Function画面

・左右の矢印キーを用いて、スリープ機能が作動するまでの時間を選択します。
・ENTERキーを押すと、User Preferences画面へ戻ることができます。

3.11 Pulse Tracシステム

正確な減衰波を供給し、効果的な形質転換を行うために、Gene Pulser XcellにはPulse Tracシステムが使用されています。Pulse Tracシステムは実際に供給されたパルスのタイムコンスタントと振幅を正確に算出します。さらに、様々なサンプルの抵抗値による振幅を補正し、低電圧時のコンデンサ容量をより正確に修正します。この機能により、以下の効果を得ることができます。
・サンプルの伝導率を測定し、10～1000Ωの抵抗値を示すサンプルに対して、正確な波形のパルスを供給することができます。
・装置内部での校正や回路のモニターにより、常に正確なパルスを供給することができます。
・タイムコンスタントや電圧の振幅を測定し、供給されるパルスを検査します。

3.11.1 Pulse Tracシステムの概要

Pulse Tracシステムは装置の内部抵抗やキュベット内のサンプルの抵抗をモニターし、調整します。サンプルの抵抗値は、伝導率、キュベットの電極間距離、キュベット内のメディウムの量に依存しています。Pulse Trac回路はサンプルの抵抗値をモニターし、サンプルの量や伝導率に関わりなく適切な電圧のパルスを供給します。Pulse Tracシステムにより、エレクトロポレーションの電気的な条件は正確に制御されます。このため、条件検討の際には、生物的な条件のみを反映した実験系を組むことができます。Pulse Trac診断アルゴリズムは電気回路全体を検査し、最も正確で再現性のあるパルスを供給するためのコンデンサの組み合わせを決定します。このため、装置の耐用期間を通じて安定したエレクトロポレーションを行うことができます。

3.11.2　Pulse Trac診断アルゴリズム

Pulse Trac診断アルゴリズムは、Gene Pulser Xcell main unitとCE moduleのコンデンサを検査し、最適な組み合わせを決定します。この機能は、低電圧／高コンデンサ容量でパルスを供給する際に有効です。200～1075μFの範囲では、Pulse Trac診断アルゴリズムによりコンデンサの誤差は±20%から±10%へと圧縮されます。高電圧で使用するコンデンサの誤差は既に10%であるため、これらはPulse Trac回路には含まれていません。

Pulse Trac診断アルゴリズムは、CE moduleが接続されている場合、装置の電源を入れると起動します。

第4章　エレクトロポレーションの原理

エレクトロポレーションは、高電圧の電場により細胞膜の一時的な再配列を生じさせる物理的な処置といわれています。この結果、細胞は浸透性を増し、周囲に溶解している核酸、タンパク質、炭水化物、低分子などを取り込みます。エレクトロポレーションの過程で、細胞の浸透性が増す原理については多くの研究がなされてきましたが、膜の変性によるという考え方は未だに仮説です（Chang et al.,1992）。

Gene Pulser Xcellは、減衰波と矩形波（図4.1）の両方を供給する、エレクトロポレーション専用の装置です。システムはパルス発生部（main unit、CE module、PC module）、ショッキングチャンバー、電極の付いたキュベット（§2を参照）からなります。PULSEボタンを押すと、main unitやCE moduleのコンデンサの蓄電が開始され、その後、キュベット内のサンプルへ放電されます。放電により、減衰波や矩形波が供給されます。

エレクトロポレーションでは、細胞に影響を与える機械的な要素は２つあります。１つは電場強度Eです。電場強度はvolts/cmで表現され、キュベット内の電気的な環境を示します。一般的なエレクトロポレーションでは、２つの電極が特定の距離（ｄ）をもって並行に向かい合っています。そのため、電場強度は
E=V/d
と表されます。Vは供給された電圧、dはキュベットの電極間距離です。実験上、電場強度は装置の設定電圧とキュベットの電極間距離を変更して制御します。細胞質の伝導率は、細胞膜の伝導率よりも非常に高いため、細胞を電場にさらすと細胞膜の内外で電位差が生じます。電場強度が上昇すると細胞膜周囲の電圧が上がり、脂質の層が破壊されて孔が開き、周囲の分子が細胞内へ移行します（Hui,1995, Neumann et al.,2000）。

細胞に影響を与える2つ目の要素は、細胞が電場にさらされる時間です。減衰波の場合、これは装置のコンデンサ容量と回路の抵抗で制御されます。矩形波の場合は、直接細胞が電場にさらされる時間を指定します。

4.1　減衰波

Gene Pulser Xcellの減衰波回路は、コンデンサの放電により電気パルスを発生させます。コンデンサがサンプルに対して放電を行うと、電極間の電圧は直ちに設定した値まで上昇し、次式のように時間（t）と共に下降します。

$V_t=V_0\,[e^{-(t/RC)}]$

V_0は初期の電圧、V_tは時間t（msec）における電圧、eは自然対数の底、Rは回路全体の抵抗値（Ω）、Cはコンデンサ容量（μF）を表します。電圧がV_0からV_0/eまで降下するまでの時間をタイムコンスタントτ（msec）と定義し、便宜的にパルス幅を表す値として使用されています。t=τ=R×Cのとき、電圧は1/e（～37%）まで下降しています（$V_\tau=V_0/e$）。

装置のコンデンサ容量や回路の抵抗が変更された場合、タイムコンスタントも変化します。高抵抗なメディウム（多くの菌類や細菌に使用されるイオン強度の小さいものなど）を使用した場合、回路の抵抗値は、サンプルと並列に設置される抵抗器をもつPC moduleによって制御されます。並列に設置される抵抗器の存在により、回路全体の抵抗値は次式で表されます。

$R_T=(R_{sample}\times R_{PC})/\ (R_{sample}+R_{PC})$

サンプルの抵抗値がPC moduleの抵抗値より極めて大きい場合（$R_{sample}>>R_{PC}$）、回路全体の抵抗値はほぼPC moduleによって決定されます（$R_T\sim R_{PC}$）。このため、PC moduleは回路全体の抵抗値を減少させ、結果として、タイムコンスタントを減少させます。

多くの哺乳動物細胞で使用されるPBSや培地のような抵抗の小さいメディウムを使用する場合、タイムコンスタントはCE moduleを用いて適切なコンデンサを選択することにより制御されます。また、キュベット内のメディウムの量を変更することによっても、回路の抵抗値を変更することができます（抵抗値はメディウムの量に反比例します）。

4.2　矩形波

コンデンサよりサンプルに放出された電気パルスを中断することにより、矩形波を供給します。理想的な矩形波は、パルス供給の開始時と終了時の電圧が等しくなります（図4.1B）。しかしながら、コンデンサの解放により矩形波を発生させる場合、終了時の電圧（V_t）は開始時の電圧（V_0）より低くなります。これは、蓄電されたコンデンサの解放による電流が、解放時は最大で、次第に低下していくためです。矩形波を供給するためには、供給されたパルスをあるタイミング（t）で中断する必要があります。このタイミング（t）がパルス幅となります。パルス幅が大きくなるにつれて、開始時の電圧と終了時の電圧の差は大きくなります。このときの電圧低下は次式で表されます。

$\ln(V_0/V_t)=t/(RC)$

矩形波の電圧低下は装置のコンデンサ容量とサンプルの抵抗に反比例します。パルス供給の開始時から終了時における電圧の低下はdroopと呼ばれ、次式で定義されます。

$Droop=(V_0-V_t)/V_0$

２式をあわせると、以下のようになります。

$\ln[1/(1-droop)]=t/(RC)$

パルスをより正確な矩形波に近づけるために、droopは最小限に抑えられる必要があります。すなわち、RおよびCを大きくする必要があります。サンプルの抵抗値が一定であると仮定します。高電圧回路では50μF、低電圧回路では3275μFのコンデンサを使用します。よって、いずれの回路においてもCは一定となります。以上より、同じサンプルの場合、パルス幅が大きくなるとdroopも大きくなります。しかし、サンプルの抵抗値が大きくなると、droopは減少します。サンプルの抵抗値は、（１）サンプルの温度の低下、（２）溶液のイオン濃度の低下、（３）抵抗値の低いメディウムを使用している場合は液量の減少により、増加します。サンプルと並列に設置される抵抗器であるPC moduleは、droopを増大させるため、矩形波には使用されません。表4.1には、低電圧、高電圧それぞれにおけるパルス幅、droop、サンプルの抵抗値の関係が示されています。例えば、高電圧回路を用い、抵抗が200Ωのサンプルに対してパルス幅0.510msecの矩形波を供給すると、droopは5%となり、低電圧回路で、抵抗が200Ωのサンプルに対してパルス幅33.4msecの矩形波を供給すると、droopは5%となります。

表4.1　パルス幅、サンプルの抵抗値とdroopの関係。

	高電圧回路			低電圧回路		
Droop%	5	10	20	5	10	20
サンプルの抵抗 (Ω)	パルス幅 (msec)			パルス幅 (msec)		
20	0.051	0.109	0.223	3.34	7.14	14.6
200	0.510	1.09	2.23	33.4	71.4	146
1000	2.55	5.45	11.2	167	357	730
3500	8.93	19.1	39.0	585	1249	2556

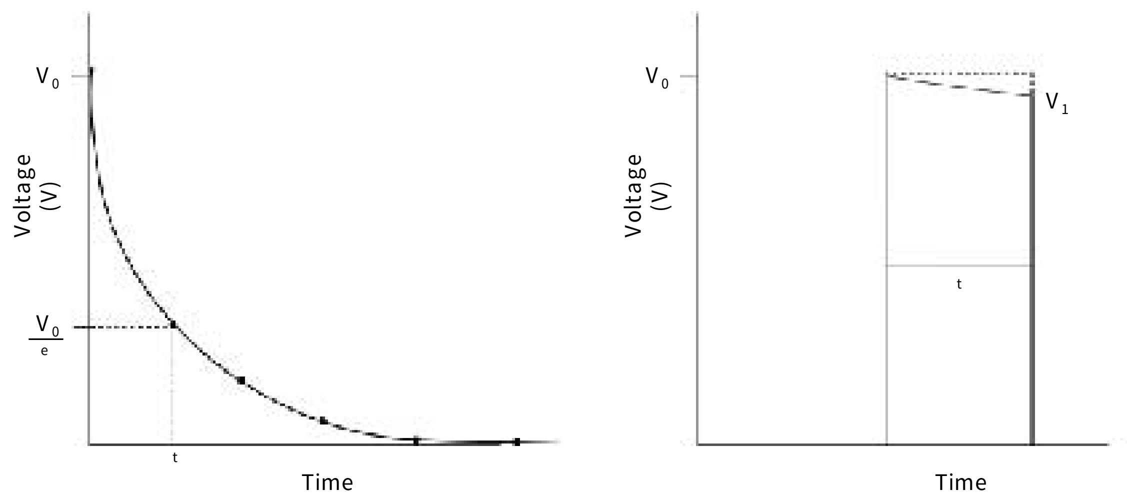


図4.1　（A）コンデンサの解放による減衰波。V_0まで蓄電されたコンデンサを解放すると、細胞へ供給された電圧は時間と共に指数的に減少します。ある時点tでの電圧Vは、$V=V_0 [e^{-(t/RC)}]$ で表されます。t=CRの場合、$V=V_0/e$となります。CRの値は、電圧低下のタイムコンスタントとして知られています。タイムコンスタントが短いほど、電圧の低下は早くなります。
（B）コンデンサの解放による矩形波。パルス幅は細胞が電場にさらされている時間です。パルスが供給されている間は、電圧は減衰波と同様、指数的に減少します。このため、パルス供給の終了時の電圧は、開始時よりも低下しています。この電圧の低下はdroopと呼ばれ、初期電圧に対する割合として測定されます。

第5章　エレクトロポレーションに影響を与える要素

エレクトロポレーションの電気的な条件については、様々な検証がなされてきました（Shigekawa & Dower, 1988, Change et al.,1992, Nickoloff,1995a,b. 概要および多くの種へのプロトコール）。エレクトロポレーションの条件検討を行う際には、以下の文献が参考になります。Calvin & Hanawalt,1988, Dower et al.,1988（以上、細菌）、Shillito et al.,1985, Fromm et al., 1987, Dekeyser et al.,1990, Joersbo & Brunstedt,1991（以上、植物細胞）、Chu et al.,1987, Knutson & Yee,1987, Andreason & Evans,1989, Anderson et al.,1989, Heiser,1999（以上、哺乳動物細胞）。微生物の場合、E. coliやS.cerevisiaeのように広く用いられている細胞の条件を参考にして、減衰波を使用します。パルスの条件は高電圧／低コンデンサ容量で使用します。E. coliの場合、電場強度は～18kV/cm、タイムコンスタントは～5msec程度が望ましいとされています。Salmonella、Borrelia、Lactococcus、Enterococcusなどの細菌では、E. coliで用いられているものと同様の条件が使用されています。その他の細菌の場合も、電場強度を検討することで、効率の良いエレクトロポレーションを行うことができます。S.cerevisiaeは、電場強度は～7.5kV/cm、タイムコンスタントは～5msec程度が良い結果を出しています。他の酵母にも同様の条件が使用されています。

植物プロトプラストのエレクトロポレーションでは、高電圧／低コンデンサ容量および低電圧／高コンデンサ容量の条件で減衰波が使用されています。典型的には、タイムコンスタント0.01～0.1msec、電場強度2.5～5kV/cmもしくはタイムコンスタント2～5msec、電場強度0.5kV/cm程度が使用されています。

哺乳動物細胞の場合、適切な条件が減衰波、矩形波ともに報告されています。典型的な条件は、タイムコンスタントもしくはパルス幅10～40msec、電場強度400～900V/cm。一般に、適切な電場強度とタイムコンスタントもしくはパルス幅の間には反比例の関係があるといわれています。適切な条件を維持するためには、一方を増加させた場合、他方を減少させます。また、細胞が大きくなると、適切な電場強度は一般に小さくなります。エレクトロポレーションの効率に影響を与えるその他の条件については、以下に記載されています。

5.1　細胞の成長

細胞を採取する際の適切な成長段階は、それぞれの細胞によって異なります。新たな種の細胞のコンピテントセルを作成する場合は、一般に同じ属の細胞で用いられている条件を初めに使用します。エレクトロコンピテントセルを作成する際の考慮すべき要素や一般的な方法については、Dower et al.,1992やTrevors et al.,1992の報告に記載があります。ほとんどの菌類では、対数増殖期の前半に採取された細胞が高い導入効率を示します。E. coliの場合、静止期に入ると導入効率は急激に低下します（Dower,1990）。一方、ほとんどの酵母は一般に対数増殖期の後半に採取されます。S.cerevisiaeでは、対数増殖期の初期に採取したものと比較して、終期に採取したものは導入効率が60倍ほど高くなります（Becker & Guarente,1991）。哺乳動物細胞の場合は、対数増殖期の中ごろに採取された細胞が高い導入効率を示します（Anderson et al.,1991）。

5.2　DNA

エレクトロポレーションでは、RNA、タンパク質、その他の低分子などほとんど全ての種類の分子を細胞に導入することができますが、多くの場合、プラスミドDNAが導入されています。わずかな例外を除き、自律的に複製するスーパーコイル状のプラスミドを導入すると、高い導入効率を得ることができます。これは、微生物、植物、動物のいずれについても当てはまります。しかし、細胞のゲノムへ、導入したプラスミドを組み込む場合は、直鎖状のプラスミドが効率的です。例えば、哺乳動物細胞（Barsoum,1995）、Candida（Thompson et al.,1998）、Pichia（Cregg & Russell,1998）、Tetrahymena（Gaertig & Gorovsky,1995）などの報告がそれに該当します。ある細胞では、サケ精子DNAやプラスミドなどをキャリアとして加えると発現が向上するという報告もあります（Chu et al.,1987, Showe et al.,1990）。

ほとんどの細胞の形質転換は、様々な方法で単離されたプラスミドDNAを用いて行われますが、プラスミドの精製度も形質転換効率に影響を与えます。精製度の高いプラスミドと比較して、精製度の低いプラスミドを使用した場合の形質転換効率は著しく低くなります。バイオ・ラッドのAurumを用いて精製されたプラスミドは、微生物や哺乳動物細胞へのエレクトロポレーションにおいて、塩化セシウム法で精製されたプラスミドと同様の導入効率を実現します。プラスミドの調製が同じ手順である場合でも、導入する遺伝子の転写や翻訳の差により発現量は変化します。

ライゲーション後の反応液をそのままE. coliと混合してエレクトロポレーションを行う場合、反応液中の物質は形質転換に影響を及ぼします（Dower,1990）。ライゲーションの反応液を加熱（65℃、15分）した後、水による希釈（Wilson & Gough,1988）、透析（Heery & Dunican,1989, Jacobs et al.,1990）、エタノール沈殿（Bottger,1988, Zabarovsky & Winberg,1990）等を行うことにより、形質転換効率を向上させることができます。

5.3　エレクトロポレーション･メディウム

多くの微生物は、抵抗の高いメディウム（＞3000Ω）を使用することで効率の良いエレクトロポレーションを行うことができます。このため、コンピテントセルの調製時には、培地に含まれるイオンを十分に除去することが重要です。イオンの除去が不十分な場合、高い電場強度によりサンプルはアーク放電を起こしてしまいます。サンプルは、水もしくはグルコース、グリセロール、スクロース、ソルビトールのようなイオンを含まない溶液で、最低３回は洗浄する必要があります。多くの微生物の場合、10〜15%グリセロールはエレクトロポレーション･メディウムとして適しています。10〜15%グリセロールは、培養細胞を保存する際の凍結防止剤として推奨されています。

いくつかの菌類では、少量（〜1mM）の$MgCl_2$をメディウムに添加することで、導入効率を向上させることができます。少なくともいくつかの菌種においては、Mg^{++}は細胞膜の構造を維持する効果があるとされています。例えば、Pseudomonas aeruginosaは2価イオンのキレート剤に高い感受性を示します。EDTAの存在下で細胞をインキュベートすると、細胞膜が不安定化されます（Haque & Russell,1974）。Mg^{++}が存在しない場合、エレクトロポレーション後の細胞膜は、回復することができません。

図5.1AおよびBは、いくつかの生物に重要なイオンがサンプルの抵抗値に及ぼす影響を示しています。以下の点には注意が必要です。（１）キュベット内の液量はサンプルの抵抗値に大きな影響を与えます。サンプルの抵抗値はキュベット内の液量に反比例します。（２）２価イオンを含む溶液の抵抗値は、同濃度の１価イオンを含む溶液の抵抗値よりも低くなります。（３）緩衝液の抵抗値はpHの影響を受けます。

少量のイオンであっても、高い抵抗値を持つサンプルに添加された場合はアーク放電の原因となります。エタノール沈殿の際に残留した塩は、DNAを水やTris-EDTAに溶解する前に洗浄し、除去します。表5.1は、10mM Tris,pH8.0－1mM　EDTAに溶解されたプラスミドを水に加え、サンプルの抵抗値が減少することを示したものです。高い抵抗値をもつメディウムを使用した菌類のエレクトロポレーションでは、このことは考慮される必要があります。酵素反応後のDNAを直接形質転換へ用いる場合もありますが、エレクトロポレーションに使用するサンプルの最終的な塩濃度は、高電圧下では、5meq以下に保つ必要があります。

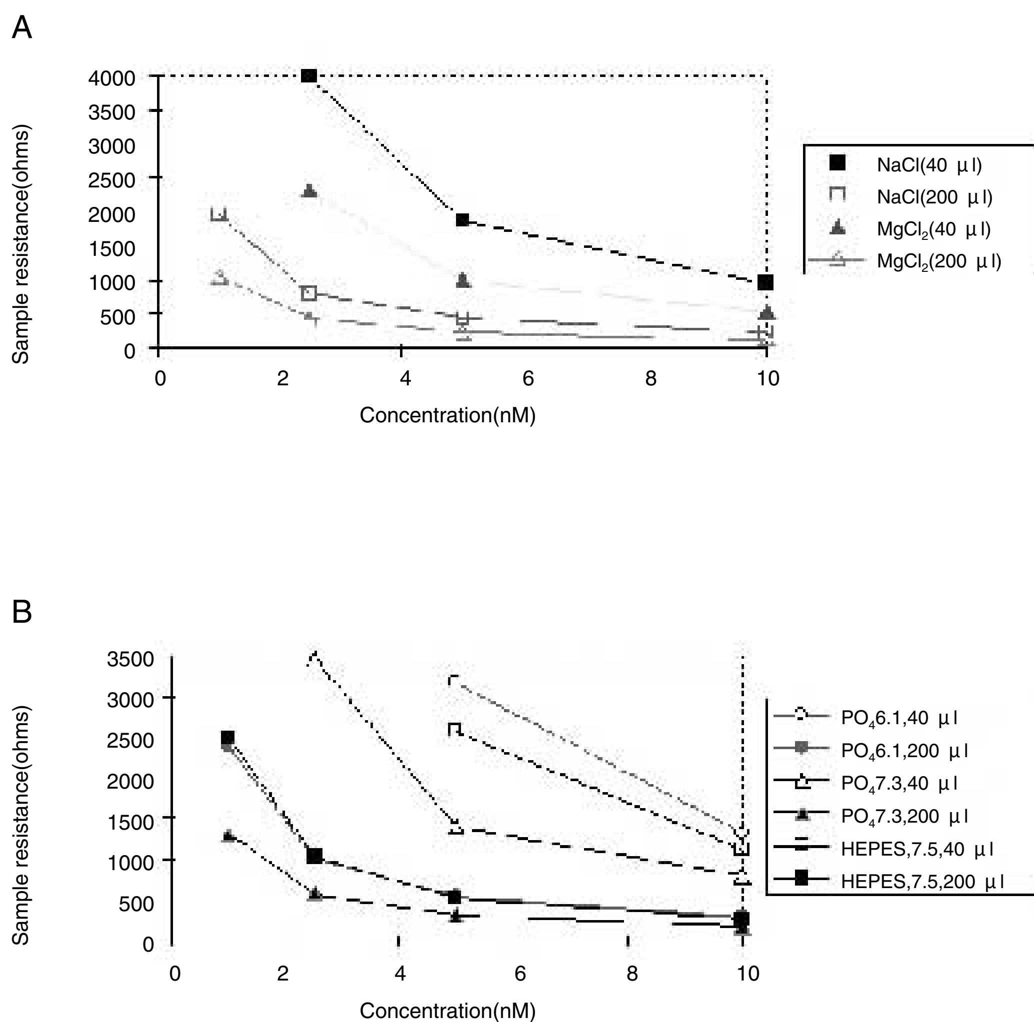


図5.1　各種の溶液の抵抗値。（A）NaClおよび$MgCl_2$。（B）緩衝液（$NaPO_4$およびHEPES）。
抵抗値は、電極間距離0.2cmのキュベットに40µlもしくは200µlの溶液を加え、室温で測定しました。

表5.1　TEを加えた水の抵抗値。

サンプル	R_{sample}(Ω) (40µl volume)	R_{sample}(Ω) (200µl volume)
Water	＞600,000	＞600,000
Water+1µl TE	＜600,000	35,000
Water+5µl TE	11,200	8,700
Water+10µl TE	1,850	4,700

抵抗値は、電極間距離0.2cmのキュベットに40µlもしくは200µlの水を入れ、各容量のTEを加えて室温で測定しました。測定に使用した電圧は1000Vです。

5.4　温度

いくつかの理由から、エレクトロポレーションの際に細胞が扱われる温度は、導入効率に影響を与えると考えられています。第一に、パルスが供給されると細胞は加熱されるため、細胞を低温に保ち、過熱を抑える必要があります。過熱を抑えることで細胞の生存率を向上させることができます。第二に、エレクトロポレーションの過程では、細胞膜には一時的に孔が形成されます。細胞を低温に保つことで孔をより長い時間開けておき、多くのDNAが細胞内へと移行できるようにすることができます。一方で、高い温度では細胞膜の回復が早く進み、細胞の生存率は向上します。第三に、メディウムの温度変化は伝導率を変化させます。温度上昇とともにメディウムの伝導率が上がると、サンプルの抵抗は減少し、タイムコンスタント（τ）も減少します。最後に、拡散率は温度の影響を大きく受けます。低温化では細胞膜の内外を移動する分子が減少すると考えられます。実際には、適切な温度は実験的に決定する必要があります。ほとんどの菌類では、採取からエレクトロポレーションまでを４℃以下で取り扱うことが適切です。E. coliの形質転換では、20℃でパルスを供給した場合、効率が100分の1程度まで低下しています（Shigekawa & Dower,1988）。一方で、S.aureusはエレクトロポレーションの前に室温でインキュベートされています（Lee,1995）。ほとんどの哺乳動物細胞では、エレクトロポレーションの前後を通じて室温での取り扱いが適切です（Chu et al.,1987）。しかし、ある種の細胞は低温で取り扱うことにより、より高い導入効率を得ることができます（Potter et al.,1984）。

第6章　細菌のエレクトロポレーション

ほとんどの菌種において、エレクトロポレーションは迅速で簡単な形質転換法です。特にグラム陰性菌といくつかのグラム陽性菌では、エレクトロポレーションは接合や化学的手法と比較して、高い形質転換効率を示します。

6.1　Escherichia coli

6.1.1　エレクトロコンピテントセルの調製

詳細な情報はAusubel et al.(1987)やMiller & Nickoloff(1995)の文献に記載されています。
Gene Pulser Xcellの条件：
0.1cmのキュベットを使用する場合；C=25μF、PC=200Ω、V=1.8kV
0.2cmのキュベットを使用する場合；C=25μF、PC=200Ω、V=2.5kV
もしくはC=25μF、PC=200Ω、V=3.0kV

以下の手順にはGene Pulser Xcell main unitおよびPC moduleが必要です。

1．オーバーナイトで培養したE. coli 5mlを2.8ℓフラスコ内の500ml L-Brothへ加えます。
2．37℃、300rpmで振盪培養し、OD_{600}を0.5～0.7程度にします。対数増殖期の前半で細胞を採取することで、高い導入効率を得ることができます。適切な細胞密度は系統や培養条件により異なりますが、4～5×10^7cells/ml程度が望ましいとされています。
3．細胞を氷上に20分程度おきます。これ以降、細胞は常に0℃前後で取り扱います。細胞を入れる容器は事前に氷上で冷却しておきます。細胞を氷冷済みの500ml遠沈管へ移し、4℃、4000×gで15分間遠心分離します。
4．静かに上清を取り除きます。上清が残ってしまうよりも、ある程度の量の細胞を上清とともに取り除いてしまう方が、良い結果を得ることができます。
5．ペレットを氷冷した10%グリセロール500mlに静かに懸濁します。4℃、4000×gで15分間遠心分離し、上清を静かに廃棄します。
6．ペレットを氷冷した10%グリセロール250mlに再懸濁します。4℃、4000×gで15分間遠心分離し、上清を静かに廃棄します。
7．ペレットを氷冷した20ml 以下の10%グリセロールに再懸濁します。4℃、4000×gで15分間遠心分離し、上清を静かに廃棄します。
8．ペレットを氷冷した1～2mlの10%グリセロールに再懸濁します。細胞の濃度が1～3×10^{10}cells/mlになるようにします。
9．この懸濁液を適当に分注した後、ドライアイスで凍結し、－70℃で保存します。細胞はこの状態で6ヶ月間保存できます。

6.1.2　エレクトロポレーション

1．細胞を氷上で融解します。エレクトロポレーションを行うサンプル数に合わせて、以下のものを用意します。1.5mlのマイクロチューブ（氷上）、0.1もしくは0.2cmのキュベット（氷上）、1mlのSOCを加えた17×100mlのチューブ（室温）。
2．氷冷済みの1.5mlポリプロピレン製マイクロチューブに、0.1cmキュベットの場合は20μl、0.2cmキュベットの場合は20～40mlの細胞懸濁液を加えます。1～2μlのDNAを加えます。DNAは、水やTEのようなイオン強度の低い溶液に溶解されている必要があります。よく混合し、氷上で1分間インキュベートします。容量の小さいキュベット内で混合することは困難なため、マイクロチューブ内でよく混合しておくことが重要です。

3．Gene Pulser XcellのHome画面からPre-set Protocols画面を開き、次いでBacterial Protocols画面を開きます。0.1cmのキュベットを使用する場合は、ENTERキーを押してE. coli,1mm cuvette Protocol Detail画面を開きます。0.2cmのキュベットを使用する場合は、「2」もしくは「3」に次いでENTERキーを押し、2.5kVもしくは3.0kVのパルスを供給するプロトコールのProtocol Detail画面を開きます。詳細は§3.4に記載されています。
4．細胞とDNAの混合液を、冷却されたエレクトロポレーション･キュベットに移し、キュベットを軽くたたいてサンプルを底に集めます。キュベットをShockPodに設置し、ShockPodの蓋を閉じます。
5．PULSEボタンを押します。
6．ShockPodからキュベットを取り出し、すぐに1mlのSOC培地を加えます。パスツールピペットを用いて、すばやく静かに懸濁します。パルスの供給から培地の添加までの時間は、E. coliの回復に大きな影響を及ぼします（Dower et al,1988）。パルス供給の1分後に培地を加えた場合、導入効率が3分の1程度になる場合もあります。パルス供給の10分後程度までは、導入効率の減少が見られ、20分の1まで落ちてしまう場合もあります。
7．細胞懸濁液を17×100mmのポリプロピレン製チューブへ移し、37°C、225rpmで1時間振盪培養します。
8．抗生物質を含むLBプレートへ播種します。

6.1.3　溶液、試薬

1．L-Broth：10g Tryptone peptone、5g Yeast extract、5g NaClを1.0lの水に溶解し、オートクレーブします。
2．選択用の抗生物質を含むLB寒天プレート：上記にしたがってL-Brothを調製します。15g/lの寒天を添加し、オートクレーブします。55～60℃まで冷却した後、抗生物質を添加し、100mlシャーレに12～15mlを注ぎます。
3．10%（v/v）グリセロール：12.6gのグリセロールを90mlの水に溶かし、オートクレーブかフィルターで滅菌します。
4．TE：10mM Tris-HCl pH8.0、1mM EDTA。
5．SOB：2.0g Tryptone peptone、0.5g Yeast extract、0.2ml 5M NaCl、0.25ml 1M KClを90mlの水に溶解し、pHを7.0にします。100mlにメスアップし、オートクレーブします。1.0mlの滅菌済み1M $MgCl_2$と1.0mlの滅菌済み1M $MgSO_4$を加えます。
6．SOC：100mlのSOBに2.0mlのフィルター除菌済み1Mグルコースを加えます。

6.2　Staphylococcus aureus

6.2.1　エレクトロコンピテントセルの調製

詳細な情報はLee（1995）の文献に記載されています。
S.aureus RN4220とpLI50を使用し、以下の方法を用いることで、1×10^6transformants/μgの形質転換体を得ることができました。
Gene Pulser Xcellの条件：C=25μF、PC=100Ω、V=2.9kV
以下の手順にはGene Pulser Xcell main unitおよびPC moduleが必要です。
1．TSAプレート上で培養したS.aureus を17×100mmチューブ内の3ml B2 brothへ加えます。
2．37°C、250rpmで一晩振盪培養します。
3．1.5mlの培養液を1ℓフラスコ内の150ml B2 brothへ加えます。37°C、250rpmで振盪培養し、3～5×10^8cells/ml（OD_{600}が0.8～0.85程度）まで増殖させます。S.aureusは37℃では、およそ30分で倍増するため、培養時間は4時間程度になります。
4．細胞を氷上に15分間置き、増殖を停止させます。500mlの滅菌済み遠沈管に移し、4°C、12,000×gで15分間遠心分離します。
5．ピペットで静かに上清を取り除きます。このとき細胞のペレットは氷上に保持します。
6．細胞を滅菌済みの氷冷水500mlに再懸濁します。4°C、12,000×gで15分間遠心分離し、静かに上清を取り除きます。滅菌済みの氷冷水500mlで更に2回洗浄します。

7．ペレットを滅菌済みの氷冷した10%グリセロール25mlに再懸濁し、30mlの滅菌済みOakridgeチューブに移します。4℃、12,000×gで15分間遠心分離し、静かに上清を取り除きます。
8．細胞を10%グリセロール20mlに再懸濁し、20℃で15分間保持します。4℃、12,000×gで15分間遠心分離し、静かに上清を取り除きます。
9．細胞を10%グリセロール2mlに再懸濁します。このとき、細胞の密度は1×10^{10}cells/ml程度になります。
10. 1.5mlの遠沈管に250μlずつ分注し、ドライアイス／イソプロパノールで凍結させた後、－70℃で保存します。細胞はこの状態で数ヶ月間保存できます。

6.2.2　エレクトロポレーションの調製

1．使用するDNA（5ng～2μg、3μl以下）を滅菌済み1.5ml遠沈管に用意します。
2．コンピテントセルを室温に数分間おき、融解します。上記のDNA量に対し、50μlのコンピテントセルを加え、ピペットを用いてよく混和します。室温で30分間保持します。
3．適切な濃度の抗生物質を加えた1mlのSMMPを、17×100mmのチューブに用意し、室温におきます。0.2cmキュベットを室温におきます。
4．Gene Pulser XcellのHome画面からPre-set Protocols画面を開きます。次いでBacterial Protocols画面を開き、S.aureus のProtocol Detail画面を開きます。詳細は§3.4に記載されています。
5．室温下で、細胞とDNAの混合液を0.2cmのエレクトロポレーション･キュベットに移し、キュベットを軽くたたいてサンプルを底に集めます。キュベットをShockPodに設置し、ShockPodの蓋を閉じます。
6．PULSEボタンを押します。
7．ShockPodからキュベットを取り出し、すぐに適切な濃度の抗生物質を加えた1mlのSMMPを加えます。パスツールピペットを用いて、滅菌済みの17×100mmチューブへすばやく移します。37℃、250rpmで1時間振盪培養します。
8．パルスの実効値等を確認、記録します。タイムコンスタントは2.5msec、電圧は2.9kV程度になります。
9．抗生物質を含むtrypticase soy agar培地へ播種し、37℃で36～48時間培養します。

6.2.3　溶液、試薬

1．Trypticase soy agar（TSA）：40gのtrypticase soy agar（Becton Dickinson,Sparks,MD）を1ℓの水に溶解し、オートクレーブします。
2．B2 broth：10g casein hydrokysate（casamino acid）、25g yeast extract、5g グルコース、25g NaCl、1g K_2HPO_4を900mlの水に溶解し、pHを7.5に合わせます。1.0ℓにメスアップし、オートクレーブします。
3．0.2M sodium hydrogen maleate：11.6 g maleic anhydrideおよび4 g NaOHもしくは、13.8 g maleic acidおよび4 g NaOHを500mlの水に溶解し、オートクレーブします。
4．2×SMM：25 ml 0.2 M sodium hydrogen maleateおよび40 ml 0.1 N NaOHを混合し、pHを6.5に合わせます。5 ml 1M $MgCl_2$、42.7g スクロースを溶解し、125 mlにメスアップした後、フィルターで除菌します。
5．4×Penassay broth：17.5 g Antibiotic Medium 3 (Becton Dickinson)を250mlの水に溶解し、オートクレーブします。
6．SMMP：55ml 2×SMM、40ml 4×Penassay broth、5ml 10%（w/v）bovine albuminを混合し、pHを7.0にあわせた後、フィルターで除菌します。必要に応じて適切な濃度の抗生物質を加えます。
7．10%（v/v）グリセロール：12.6gのグリセロールを90mlの水に溶解し、オートクレーブもしくはフィルターで除菌します。

6.3　Agrobacterium tumefaciens

6.3.1　エレクトロコンピテントセルの調製

詳細な情報はLee（1995）の文献に記載されています。
Gene Pulser Xcellの条件：C=25μF、PC=200Ω、V=2.4kV
以下の手順にはGene Pulser Xcell main unitおよびPC moduleが必要です。

1．対数増殖期のA. tumefaciensを2.8lフラスコ内の1.5l YM培地へ移します。
2．30°C、300rpmで一晩培養し、細胞密度を5～10×10^7cells/ml（OD_{550}が1.0程度）にします。
3．細胞を500mlの滅菌済み遠沈管に移し、4℃、3000×gで10分間遠心分離します。
4．静かに上清を取り除きます。このとき細胞のペレットは氷上に保持します。
5．氷冷した10%グリセロールを約10ml加え、ボルテックスでペレットを再懸濁します。さらに氷冷した10%グリセロールを適量加え500mlにします。4℃、3000×gで10分間遠心分離し、静かに上清を取り除きます。
6．サンプルのチューブが複数ある場合は、この段階で全てまとめ、上記５の手順で洗浄します。
7．細胞を氷冷した滅菌済み10%グリセロール25mlに再懸濁し、30mlのOakridgeチューブに移します。4℃、3000×gで10分間遠心分離し、静かに上清を取り除きます。
8．氷冷した滅菌済み10%グリセロール0.5mlに再懸濁します。このときの細胞の量はおよそ1.5ml程度、細胞密度は5×10^{10}cells/ml程度です。細胞を直ちに使用しない場合は、凍結保存します。凍結保存は、1.5ml遠沈管に200μlずつ分注し、ドライアイス／イソプロパノールで凍結させた後、－70℃行います。細胞はこの状態で6ヶ月間保存できます。

6.3.2　エレクトロポレーション

1．使用するDNA（100ng以下、5μl以下のTE）を滅菌済み1.5ml遠沈管に用意し、氷上に保持します。
2．コンピテントセルを氷上におき、融解します。上記のDNA量に対し、20μlのコンピテントセルを加え、容器を軽くたたいて混和します。
3．それぞれのサンプルに対して17×100mmのチューブに用意し、1mlのYM培地を加えて室温におきます。0.1cmキュベットを氷上に用意します
4．Gene Pulser XcellのHome画面からPre-set Protocols画面を開きます。次いでBacterial Protocols画面を開き、A. tumefaciensのProtocol Detail画面を開きます。詳細は§3.4に記載されています。
5．細胞とDNAの混合液をエレクトロポレーション･キュベットに移し、キュベットを軽くたたいてサンプルを底に集めます。キュベットをShockPodに設置し、ShockPodの蓋を閉じた後、PULSEボタンを押します。
6．ShockPodからキュベットを取り出し、細胞を1mlのYM培地を加えた滅菌済みの17×100mmチューブへすばやく移します。
7．パルスの実効値等を確認、記録します。タイムコンスタントは5msec、電圧は2.4kV程度になります。
8．30°C、250rpmで3時間振盪培養し、選択物質を含むYM寒天培地へ播種した後、30℃で48時間培養します。

6.3.3　溶液、試薬

1．YM培地：0.4g yaest extract、10gマンニトール、0.1g NaCl、0.1g $MgSO_4$、0.5g K_2HPO_4･$3H_2O$を1ℓの水に溶解し、pHを7.0に合わせた後、オートクレーブします。寒天培地の場合は、更に15gの寒天を加えます。
2．10%（v/v）グリセロール：252gのグリセロールを1800mlの水に溶解し、オートクレーブもしくはフィルターで除菌します。

6.4 Bacillus cereus

6.4.1 エレクトロコンピテントセルの調製

以下はSilo-Suh et al.（1994）の方法を若干改変しました。
B. cereus UW85とpAD123を使用し、以下の方法を用いることで、2×10^6transformants/μgの形質転換体を得ることができました。
Gene Pulser Xcellの条件：C=50μF、PC=200Ω、V=1.0kV
以下の手順にはGene Pulser Xcell main unitおよびPC moduleが必要です。

1．B.careusのコロニーを125mlフラスコ内の10ml LBに接種し、28℃、300rpmで一晩培養します。
2．培養液2mlを2.8ℓ Fernbackフラスコ内のBHI 500mlに移し、28℃、300rpmでインキュベートします。
3．OD_{600}が0.3程度（細胞密度は1×10^7cells/ml程度）になるまで培養します。
4．培養液を氷上で10分間冷却します。
5．培養液を2本の滅菌済み250ml遠沈管に分注します。
6．4℃、10,000×gで10分間遠心分離します。
7．上清を除き、各ペレットを50mlの滅菌、氷冷済みEPバッファーに再懸濁します。上記と同様に細胞を遠心分離し、沈殿させます。
8．上清を除き、各ペレットを15mlの滅菌、氷冷済みEPバッファーに再懸濁します。氷冷済みの30ml Oakridgeチューブに移します。
9．4℃、10,000×gで10分間遠心分離します。
10. 上清を除き、0.5mlのEPバッファーに再懸濁します。細胞は、エレクトロポレーションに使用する直前まで、氷上に保持します。この方法によるコンピテントセルは、凍結保存することはできません。

6.4.2 エレクトロポレーション

1．使用するDNA（0.05～1μg、10μl以下の水もしくはTE）を滅菌済み1.5ml遠沈管に用意し、氷上に保持します。100μlのコンピテントセルを加えて混和し、5～10分間、氷上に保持します。
2．100μlのプラスミド／細胞混合液を氷冷した0.2cmキュベットに移し、軽くたたいてサンプルを底に集めます。
3．それぞれのサンプルに対して17×100mmのチューブを用意し、2.0mlのLBを加えて室温におきます。
4．Gene Pulser XcellのHome画面からPre-set Protocols画面を開きます。次いでBacterial Protocols画面を開き、B. cereusのProtocol Detail画面を開きます。詳細は§3.4に記載されています。
5．キュベットをShockPodに設置し、ShockPodの蓋を閉じた後、PULSEボタンを押します。
6．ShockPodからキュベットを取り出し、細胞を用意しておいた17×100mmチューブへすばやく移します。
7．パルスの実効値等を確認、記録します。タイムコンスタントは8.6msec、電圧は1.0kV程度になります。電場強度は、実効電圧（kV）／キュベットの電極間距離（cm）で計算されます。
8．37℃、250rpmで1～1.5時間振盪培養します。
9．適当な選択物質を含むLB寒天培地へ播種した後、28℃で一晩培養します。

6.4.3 溶液、試薬

1．EPバッファー（0.5mM K_2HPO_4-KH_2PO_4、0.5mM $MgCl_2$、272mMスクロース）：54.4mlの1Mスクロース、100μlの1M $MgCl_2$、190μlの0.1M KH_2PO_4、810μlの0.1M K_2HPO_4をMilli-Q水で200mlにメスアップします。pHはおよそ7.4になります。フィルターで除菌し、4℃で保存します。
2．Brain Heart Infusion（BHI）：37gのBHIを1000mlの水に溶解し、オートクレーブします。
3．L-Broth：10g Tryptone peptone、5g Yeast extract、5g NaClを1.0ℓの水に溶解し、オートクレーブします。

6.5 Pseudomonas aeruginosa

6.5.1 エレクトロコンピテントセルの調製

Dennis & Sokol（1995）およびSmith & Iglewski（1989）の方法を用います。
P. aeruginosa PAO1とpUCP19を使用し、以下の方法を用いることで、1×10^7transformants/μgの形質転換体を得ることができます。
Gene Pulser Xcellの条件：C=25μF、PC=200Ω、V=2.5kV
以下の手順にはGene Pulser Xcell main unitおよびPC moduleが必要です。

1．P. aeruginosaのコロニーを、125mlフラスコ内の25ml LBに接種し、37℃、300rpmで一晩振盪培養します。
2．培養液10mlを2.8l Fernbackフラスコ内のLB 500mlに移し、37℃、300rpmで振盪培養します。
3．OD_{600}が0.5程度（細胞密度は3×10^8cells/ml程度）になるまで培養します。
4．培養液を氷上で10分間冷却します。
5．培養液を2本の滅菌、氷冷済み250ml遠沈管に分注します。
6．4℃、2300×gで10分間遠心分離します。
7．上清を除き、各ペレットを250mlの滅菌、氷冷済みSMEBバッファーに再懸濁します。上記と同様に細胞を遠心分離し、沈殿させます。
8．上清を除き、各ペレットを125mlの滅菌、氷冷済みSMEBバッファーに再懸濁します。上記と同様に細胞を遠心分離し、沈殿させます。
9．上清を除き、各ペレットを12mlの滅菌、氷冷済みSMEBバッファーに再懸濁します。30mlの氷冷済みOakridgeチューブに移します。
10. 4℃、2300×gで10分間遠心分離します。
11. 上清を除き、2.0mlのSMEBバッファーに再懸濁します。細胞は、エレクトロポレーションに使用する直前まで、氷上に保持します。

6.5.2 エレクトロポレーション

1．使用するプラスミド0.05〜0.5μgを、サンプル数分の滅菌済み1.5ml遠沈管に用意し、氷上に保持します。100μlのコンピテントセルを加えて混和し、5〜10分間、氷上に保持します。
2．100μlのプラスミド／細胞混合液を氷冷した0.2cmキュベットに移し、軽くたたいてサンプルを底に集めます。
3．それぞれのサンプルに対して17×100mmのチューブに用意し、1.0mlのSOCを加えて室温におきます。
4．Gene Pulser XcellのHome画面からPre-set Protocols画面を開きます。次いでBacterial Protocols画面を開き、P. aeruginosaのProtocol Detail画面を開きます。詳細は§3.4に記載されています。
5．キュベットをShockPodに設置し、ShockPodの蓋を閉じた後、PULSEボタンを押します。
6．ShockPodからキュベットを取り出し、細胞を用意しておいたSOCの入った17×100mmチューブへすばやく移します。パルスの実効値等を確認、記録します。タイムコンスタントは5msec、電圧は2.5kV程度になります。電場強度は、実効電圧（kV）／キュベットの電極間距離（cm）で計算されます。
7．37℃、250〜300rpmで1時間振盪培養します。
8．抗生物質を含むLB寒天培地へ播種した後、37℃で一晩培養します。

6.5.3 溶液、試薬

1．SMEBバッファー（1mM HEPES,pH7.0、1mM $MgCl_2$、300mMスクロース）：2.0mlの0.5M HEPES,pH7.0、1.0mlの1M $MgCl_2$、102.7gのスクロースを水で1000mlにメスアップします。オートクレーブで滅菌し、4℃で保存します。
2．L-Broth：10g Tryptone peptone、5g Yeast extract、5g NaClを1.0ℓの水に溶解し、オートクレーブします。

3．選択用の抗生物質を含むLB寒天プレート：上記にしたがってL-Brothを調製します。15g/lの寒天を添加し、オートクレーブします。55～60℃まで冷却した後、抗生物質を添加し、100mlシャーレに12～15mlを注ぎます。
4．SOB：2.0g Tryptone peptone、0.5g Yeast extract、0.2ml 5M NaCl、0.25ml 1M KClを90mlの水に溶解し、pHを7.0にします。100mlにメスアップし、オートクレーブします。1.0mlの滅菌済み1M $MgCl_2$と1.0mlの滅菌済み1M $MgSO_4$を加えます。
5．SOC：100mlのSOBに2.0mlのフィルター除菌済み1Mグルコースを加えます。

6.6 Streptococcus pyogenes

6.6.1 エレクトロコンピテントセルの調製

Simon & Frretti（1995）の方法を用います。
S. pyogenes CS101とpDC123を使用し、以下の方法を用いることで、1×10^5transformants/μgの形質転換体を得ることができました（Chaffin & Rubens,1998）。
Gene Pulser Xcellの条件：C=25μF、PC=200Ω、V=2.1kV
以下の手順にはGene Pulser Xcell main unitおよびPC moduleが必要です。

1．S. pyogenesのコロニーを、25mlフラスコ内の20mMのグリシンを含む20ml THYに接種し、37℃、一晩培養します。
2．培養液18mlを500ml フラスコ内の20mMのグリシンを含むTHY 250mlに移します。穏やかに混和し、OD_{600}が0.2程度（細胞密度は3×10^7cells/ml程度）になるまで、更に2時間程度培養します。
3．培養液を氷上で10分間冷却します。
4．培養液を滅菌、氷冷済み500ml遠沈管に分注します。
5．4℃、6000×gで10分間遠心分離します。
6．ピペットで上清を除き、ペレットを10mlの滅菌、氷冷済みElpo培地に再懸濁します。約225mlにメスアップし、8000×gで遠心分離します。
7．ピペットで上清を除き、ペレットを30ml Oakridgeチューブ内の5mlの滅菌、氷冷済みElpo培地に再懸濁します。30mlにメスアップし、12,000×gで遠心分離します。
8．ピペットで上清を除き、ペレットを1.5mlの滅菌、氷冷済みElpo培地に再懸濁します。細胞は、エレクトロポレーションに使用する直前まで、氷上に保持します。

6.6.2 エレクトロポレーション

1．使用するプラスミド0.05～0.5μgを、滅菌済み1.5ml遠沈管に用意し、氷上に保持します。200μlのコンピテントセルを加えて混和し、5～10分間、氷上に保持します。
2．200μlのプラスミド／細胞混合液を氷冷した0.2cmキュベットに移し、軽くたたいてサンプルを底に集めます。
3．それぞれのサンプルに対して17×100mmのチューブに用意し、1.0mlのTHYを加えて室温におきます。
4．Gene Pulser XcellのHome画面からPre-set Protocols画面を開きます。次いでBacterial Protocols画面を開き、S. pyogenesのProtocol Detail画面を開きます。詳細は§3.4に記載されています。
5．キュベットをShockPodに設置し、ShockPodの蓋を閉じた後、PULSEボタンを押します。
6．キュベットを氷上に5分程度静置します。パルスの実効値等を確認、記録します。タイムコンスタントは9.8msec、電圧は2.1kV程度になります。電場強度は、実効電圧（kV）／キュベットの電極間距離（cm）で計算されます。
7．キュベットに1.0mlのTHYを加え、プラスミド／細胞混合液を17×100mmのチューブに移します。37℃で2時間培養します。
8．抗生物質を含むTHY寒天培地へ播種した後、37℃で1～2日培養します。

6.6.3　溶液、試薬

1．THY培地（0.2% Yaest extractを含むTodd-Hewitt培地）：30gのTodd-Hewitt培地と2gのYeast extractを1ℓの水に溶解し、オートクレーブで滅菌します。
2．THY＋グリシン：500mlのTHY培地に5mlの2Mグリシンを加えます（15g/100ml）。
3．抗生物質を含むTHY寒天培地：30gのTodd-Hewitt培地、2gのYeast extract、15gのBacto agarを1ℓの水に溶解します。オートクレーブした後、55～60℃まで冷却します。、抗生物質を添加し、シャーレに分注します。
4．　Elpo培地：122mlの20%グルコースと、0.5mlの1M $MgCl_2$を水で500mlにメスアップし、pHを6.5に合わせます。フィルターを用いて除菌します。

6.7　Lactobacillus plantarum

6.7.1　エレクトロコンピテントセルの調製

Bringel & Hubert（1990）の方法を用います。
L. plantarum NCIB7220とpGK12を使用し、以下の方法を用いることで、4×10^4transformants/μgの形質転換体を得ることができました（Chaffin & Rubens,1998）。
Gene Pulser Xcellの条件：C=25μF、PC=400Ω、V=2.0kV
以下の手順にはGene Pulser Xcell main unitおよびPC moduleが必要です。

1．L. plantarumのコロニーを、500mlフラスコ内の50mlのMRSに接種し、30℃、300rpmで一晩振盪培養します。細胞は、対数増殖期（OD_{600}＜1.5）になります。
2．培養液を2.8l Fernbackフラスコ内の500ml MRS/SGに移します。このときOD_{600}=0.05となるようにします。30℃、80rpmで振盪培養します。
3．OD_{600}が0.3になるまで（通常4時間程度）培養します。
4．室温下で、培養液を500mlの滅菌済み遠沈管に移します。
5．18℃、3000×gで10分間遠心分離します。
6．上清を除き、ペレットを室温下で250mlの滅菌水に再懸濁します。18℃、4000×gで10分間遠心分離します。
7．上清を除き、ペレットを室温下で250mlの滅菌水に再懸濁します。18℃、4000×gで10分間遠心分離します。
8．上清を除き、ペレットを2mlの30% PEGに再懸濁します。細胞は、エレクトロポレーションに使用する直前まで、氷上に保持します。

6.7.2　エレクトロポレーション

1．使用するプラスミド0.1～1.0μg（2μl以下）を、滅菌済み1.5ml遠沈管に用意し、氷上に保持します。40μlのコンピテントセルを加えて混和します。
2．40μlのプラスミド／細胞混合液を氷冷した0.2cmキュベットに移し、軽くたたいてサンプルを底に集めます。
3．Gene Pulser XcellのHome画面からPre-set Protocols画面を開きます。次いでBacterial Protocols画面を開き、L. plantarumのProtocol Detail画面を開きます。詳細は§3.4に記載されています。
4．キュベットをShockPodに設置し、ShockPodの蓋を閉じた後、PULSEボタンを押します。
5．すぐにキュベットを取り出し、氷上で30分間静置します。1mlのMRS/SGを加えたプラスミド／細胞混合液を、滅菌済みの17×100mmのチューブに移し、30℃で3～4時間培養します。
6．抗生物質を含むMRS寒天培地へ播種します。
7．30℃で2～3日培養します。

6.7.3 溶液、試薬

1. 2×MRS（グルコースを含まない）：10g Proteose Peptone No 3 (Difco #211693)、10g Beef Extract (Difco #211520)、5g Yeast Extract (Difco #212750)、1ml Tween 80、11.5 ml 1M K_2HPO_4、12.3ml 3M 酢酸ナトリウム、1.9g クエン酸、0.8ml 1M $MgSO_4$、225μl 1M $MnSO_4$を水に溶解し、500mlにメスアップします。オートクレーブで滅菌します。
2. 1×MRS：500mlの2×MRS、200mlの10%グルコース（フィルター除菌済み）、 300mlの滅菌水を混合します。
3. 抗生物質を含む1×MRS寒天培地：1ℓの容器に、7.5gのBacto agarと150mlの水を加え、オートクレーブの後、55℃まで冷却します。250mlの2×MRSと100mlの10%グルコースを55℃まで温め、寒天に加えます。抗生物質を加え、シャーレに分注します。
4. MRS/SG（0.75Mソルビトールおよび1%グリシンを含むMRS）： 250mlの2×MRS、 50mlの20%グルコース（フィルター除菌済み）、150mlの滅菌済み2.5 Mソルビトール、 33mlの2Mグリシン、17mlの滅菌水を混合します。
5. 2M グリシン：15.0gを100mlの水に溶解し、フィルターで除菌します。
6. 2.5Mソルビトール：227.8gのソルビトールをおよそ250mlの水に溶解し、500mlにメスアップします。フィルターで除菌します。
7. 30% PEG 1000：150gのPEG 1000におよそ200mlの水を加え、50°C程度で融解します。水で500mlにメスアップし、フィルターで除菌します。

第7章　菌類のエレクトロポレーション

7.1　Saccharomyces cerevisiae

7.1.1　エレクトロコンピテントセルの調製

詳細な情報はBecker & Guarante(1991)やAusubel et al.(1987)の文献に記載されています。
S. cerevisiae　Sc948とYep352を使用し、以下の方法を用いることで、5×10^5transformants/μg以上の形質転換体を得ることができました。
Gene Pulser Xcellの条件：

　　0.2cmのキュベットを使用する場合；C=25μF、PC=200Ω、V=1.5kV
　　0.4cmのキュベットを使用する場合；C=25μF、PC=200Ω、V=2.5kV

以下の手順にはGene Pulser Xcell main unitおよびPC moduleが必要です。

1．オーバーナイトで培養したS. cerevisiaeを2.8ℓ　Fernbackフラスコ内の500ml　YPDへ加えます。S. cerevisiaeは30℃では、およそ2時間で倍増します。
2．30℃、250rpmで一晩振盪培養し、細胞密度を1×10^8cells/ml程度（OD_{600}=0.3～0.35、10倍希釈）にします。
3．細胞を氷上に15分程度おき、増殖を停止させます。
4．細胞を500mlの遠沈管に移し、4℃、4000×gで5分間遠心分離します。
5．静かに上清を取り除き、氷上に静置します。
6．80mlの滅菌水を加え、ボルテックスを用いて再懸濁します。
7．10mlのTEを加え、混和します。10mlのLithium　Acetateを加え、混和します。30℃、約85rpmで45分間振盪します。
8．2.5ml 1MのDTTを加え、混和し、30℃、約85rpmで15分間振盪します。
9．滅菌水を加えて、500mlにメスアップします。4℃、4000×gで5分間遠心分離し、上清を除きます。
10. 氷冷した滅菌水を約50ml加え、ボルテックスを用いて再懸濁します。氷冷した滅菌水を加えて500mlにメスアップします。4℃、4000×gで5分間遠心分離し、上清を除きます。
11. 滅菌、氷冷した1Mソルビトールを25～30ml加え、氷冷済みの30ml Oakridgeチューブに移します。4℃、4000×gで5分間遠心分離し、上清を除きます。
12. ペレットを滅菌、氷冷した1Mソルビトール0.5mlに懸濁します。この時点で、細胞の量は1.3～1.5ml、濃度は1×10^{10}cells/ml程度です。細胞は、エレクトロポレーションに使用する直前まで、氷上に保持します。

7.1.2　エレクトロポレーション

1．エレクトロポレーションを行うサンプル数に合わせて、1mlの1Mソルビトールを加えた17×100mm滅菌チューブを用意し、氷上におきます。0.2もしくは0.4cmのキュベットを必要数用意し、氷上に保持します。
2．使用するDNA（5～100ng、5μl）を滅菌済みの1.5ml遠沈管に加え、氷上に保持します。
3．0.2cmキュベットの場合は40μl、0.4cmキュベットの場合は80μlのコンピテントセルをDNAに加えます。静かに混和し、氷上に5分ほど静置します。
4．Gene　Pulser　XcellのHome画面からPre-set　Protocols画面を開き、次いでFungal　Protocols画面を開きます。0.2cmのキュベットを使用する場合は、ENTERキーを押してS. cerevisiae,2mm cuvette Protocol Detail画面を開きます。0.4cmのキュベットを使用する場合は、「２」に次いでENTERキーを押しS. cerevisiae,4mm cuvette Protocol Detail画面を開きます。詳細は§3.4に記載されています。
5．DNAと細胞の混合液をキュベットに入れ、軽くたたいてサンプルを底に集めます。キュベットをShockPodに設置し、ShockPodの蓋を閉じます。PULSEボタンを押します。

6．キュベットを取り出し、すぐに1mlの氷冷済み1Mソルビトールを加えます。細胞を静かに滅菌済み17×100mmチューブへ移します。
7．パルスの実効値等を確認、記録します。タイムコンスタントは5msec、電圧は、0.2cmキュベットの場合は1.5kV程度、0.4cmキュベットの場合は2.5kV程度になります。
8．1Mソルビトールを含む選択培地へ分注し、30℃で48～72時間培養します。

7.1.3　溶液、試薬

1．YPD：10gのyeast　extractおよび20gのpeptoneを900mlの水に溶解します。オートクレーブし、100mlの滅菌済み20％グルコースを加えます。
2．1Mソルビトール：182.2gのソルビトールを800mlの水に溶解します。水で1ℓにメスアップし、オートクレーブします。
3．20％グルコース：20gのグルコースを60mlの水に溶解します。水で100mlにメスアップし、0.22μmのフィルターで除菌します。

7.2　Schizosaccharomyces pombe

7.2.1　エレクトロコンピテントセルの調製

詳細な情報はPrentice(1991)の文献に記載されています。
S. pombe CHP408とpART1(Apolinario et al.,1993)を使用し、以下の方法を用いることで、3×10^5transformants/μgの形質転換体を得ることができました。
Gene Pulser Xcellの条件：C=25μF、PC=200Ω、V=2.3kV
以下の手順にはGene Pulser Xcell main unitおよびPC moduleが必要です。
1．オーバーナイトで培養したS. pombeを2.8ℓ　Fernbackフラスコ内の200ml YCDへ加えます。このときのOD_{600}は0.1程度が適当です。S. pombeは30℃では、およそ2時間で倍増します。
2．30℃、250rpmで一晩振盪培養し、およそ2×10^8cells/ml（OD_{600}=0.4～0.5程度、20倍希釈）とします。
3．細胞を氷上に15分程度おき、増殖を停止させます。
4．細胞を250mlの遠沈管に移し、4℃、4000×gで5分間遠心分離します。
5．静かに上清を取り除き、氷上に静置します。
6．50ml程度の滅菌、氷冷済み1.2Mソルビトールを加え、ボルテックスを用いて再懸濁した後、約250mlにします。4℃、4000×gで5分間遠心分離し、上清を除きます。
7．約200mlの1.2Mソルビトールを用いて、上記の洗浄を繰り返します。
8．ペレットを約10mlの1.2Mソルビトールに再懸濁し、30mlの滅菌済みOakridgeチューブに移します。遠沈管を15～20mlの1.2Mソルビトールですすぎ、Oakridgeチューブに移します。4℃、4000×gで5分間遠心分離し、上清を除きます。
9．ペレットを3mlの1.2Mソルビトールに再懸濁し、エレクトロポレーションに使用する直前まで、氷上に保持します。

7.2.2　エレクトロポレーション

1．エレクトロポレーションを行うサンプル数に合わせて、1mlの1.2Mソルビトールを加えた17×100mm滅菌チューブを用意し、氷上におきます。0.2のキュベットを必要数用意し、氷上に保持します。
2．使用するDNA（1μg以下）を滅菌済みの1.5ml遠沈管に加え、氷上に保持します。40μlのコンピテントセルをDNAに加え、静かに混和します。
3．Gene Pulser XcellのHome画面からPre-set Protocols画面を開き、次いでFungal Protocols画面を開きます。S. pombeのProtocol Detail画面を開きます。詳細は§3.4に記載されています。

4．DNAと細胞の混合液をキュベットに入れ、軽くたたいてサンプルを底に集めます。キュベットをShockPodに設置し、ShockPodの蓋を閉じます。PULSEボタンを押します。
5．キュベットを取り出し、すぐに1mlの氷冷済み1.2Mソルビトールを加えます。細胞を静かに滅菌済み17×100mmチューブへ移します。
6．パルスの実効値等を確認、記録します。タイムコンスタントは5msec、電圧は2.3kV程度になります。
7．室温で40～60分間静置し、ソルビトールを含まない選択培地（EMM等）へ分注し、30℃で6～8日間培養します。

7.2.3　溶液、試薬

1．YCD：10gのyeast extractおよび2gのカザミノ酸を900mlの水に溶解します。オートクレーブし、100mlの滅菌済み20%グルコースを加えます。
2．1.2Mソルビトール：218.6gのソルビトールを700mlの水に溶解します。水で1ℓにメスアップし、オートクレーブします。
3．EMM：12.35gのEMM-Dextrose（Q-Biogene）を900mlの水に溶解します。2本の1ℓ瓶に450mlずつ分注し、寒天を10.0gずつ加えます。30分間オートクレーブし、55～60℃まで冷却します。それぞれに50mlの20%グルコースを加え、シャーレに注ぎます（およそ60枚分）。

7.3　Pichia pastoris

7.3.1　エレクトロコンピテントセルの調製

詳細な情報はCregg & Russell(1998)の文献に記載されています。
P. pastoris X33とSacl-pPICZA(Invitrogen)を使用し、以下の方法を用いることで、およそ6×10^4transformants/μgの形質転換体を得ることができました。
Gene Pulser Xcellの条件：C=25μF、PC=200Ω、V=2.0kV
以下の手順にはGene Pulser Xcell main unitおよびPC moduleが必要です。

1．オーバーナイトで培養したS. pastorisを2.8ℓ Fernbackフラスコ内の500ml YCDへ加えます。S. pastorisは30℃では、およそ2時間で倍増します。
2．30℃、300rpmで一晩振盪培養し、およそ7×10^7cells/ml（OD_{600}=0.24～0.30程度、10倍希釈）とします。
3．細胞を500mlの遠沈管に移し、4℃、3000×gで5分間遠心分離します。
4．静かに上清を取り除きます。
5．100mlの滅菌済みYPD/HEPESを加え、ボルテックスを用いて再懸濁します。2.5mlの1M DTTを加えて混和し、30℃で5分間静置します。
6．滅菌、冷却した1Mソルビトールを加えておよそ500mlとします。4℃、3000×gで5分間遠心分離し、静かに上清を取り除きます。
7．滅菌、冷却した1Mソルビトールを約50ml加え、ボルテックスを用いて再懸濁します。滅菌、冷却した1Mソルビトールを用いて、500mlにメスアップします。4℃、3000×gで5分間遠心分離し、静かに上清を取り除きます。
8．滅菌、冷却した1Mソルビトールを約25ml加えて再懸濁し、氷冷済みの30ml Oakridgeチューブに移します。4℃、3000×gで5分間遠心分離し、静かに上清を取り除きます。
9．滅菌、冷却した1Mソルビトールを0.5ml加えて再懸濁します。この段階で、細胞の量は1.3ml程度、濃度は1×10^{10}cells/ml以上になります。細胞は、エレクトロポレーションに使用する直前まで、氷上に保持します。

7.3.2 エレクトロポレーション

1．エレクトロポレーションを行うサンプル数に合わせて、1mlの1Mソルビトールを加えた17×100mm滅菌チューブを用意し、氷上におきます。0.2のキュベットを必要数用意し、氷上に保持します。
2．使用するDNA（0.1μg以下）を滅菌済みの1.5ml遠沈管に加え、氷上に保持します。
3．40μlのコンピテントセルをDNAに加え、静かに混和します。
4．Gene Pulser XcellのHome画面からPre-set Protocols画面を開き、次いでFungal Protocols画面を開きます。S. pastorisのProtocol Detail画面を開きます。詳細は§3.4に記載されています。
5．DNAと細胞の混合液をキュベットに入れ、軽くたたいてサンプルを底に集めます。キュベットをShockPodに設置し、ShockPodの蓋を閉じます。PULSEボタンを押します。
6．キュベットを取り出し、すぐに1mlの氷冷済み1Mソルビトールを加えます。細胞を静かに滅菌済み17×100mlチューブへ移します。
7．パルスの実効値等を確認、記録します。タイムコンスタントは5msec、電圧は2.0kV程度になります。
8．栄養要求性変異株の相補性で選択する場合は、細胞を、栄養分を含まない最小培地へ移します。抗生物質への耐性で選択する場合は、30℃で1時間培養し、1mlの1Mソルビトールを加えてさらに1時間培養した後に、抗生物質を含むYPD寒天培地に播種します。その後、30°Cで72～96時間培養します。

7.3.3 溶液、試薬

1．YPD：10gのyeast extractおよび20gのpeptoneを900mlの水に溶解します。オートクレーブし、100mlの滅菌済み20%グルコースを加えます。
2．YPD/HEPES：100mlのYPDに20mlの1M HEPES,pH8.0を加えます。
3．1Mソルビトール：182.2gのソルビトールを800mlの水に溶解します。水で1ℓにメスアップし、オートクレーブします。
4．20%グルコース：20gのグルコースを60mlの水に溶解します。水で100mlにメスアップし、0.22μmのフィルターで除菌します。
5．1M HEPES,ｐH8.0：23.8gのHEPES（MW=238.3）を約65mlの水に溶解します。5NのNaOHを用いてpHを8.0に調整し、水で100mlにメスアップします。2.35gのEMM-Dextrose（Q-Biogene）を900mlの水に溶解します。0.22μmのフィルターで除菌します。
6．1M DTT：3.85gのDTTを約22mlの水に溶解します。水で25mlにメスアップし、0.22μmのフィルターで除菌します。

7.4 Candida albicans

7.4.1 エレクトロコンピテントセルの調製

詳細な情報はdeBacker et al.(1999)の文献に記載されています。
C. albicans CAI4とNhel-pUXを使用し、以下の方法を用いることで、およそ400transformants/μg以上の形質転換体を得ることができました(Thomson et al.,1998)。
Gene Pulser Xcellの条件：C=25μF、PC=200Ω、V=1.5kV
以下の手順にはGene Pulser Xcell main unitおよびPC moduleが必要です。
1．C. albicansのコロニーを5～6mlのYPD/uridineを含む17×100mmチューブへ加え、30℃、250～300rpmで一晩振盪培養します。
2．培養液を2.8l Fernbackフラスコ内の500ml YCD/uridineへ加え、30℃、250～300rpmで一晩振盪培養し、およそ5～10×10^7cells/ml（OD_{600}=0.3～0.45程度、10倍希釈）とします。
3．培養液を氷上に10分間静置します。
4．細胞を500mlの遠沈管に移します。

5．15～20℃、3000×gで5分間遠心分離します。
6．上清を取り除きます。125mlの滅菌済み5mM LiAc/10mM DTTに再懸濁し、20℃で1時間静置します。
7．4℃、3000×gで5分間遠心分離します。
8．上清を取り除き、125mlの氷冷済み滅菌水に懸濁します。4℃、3000×gで5分間遠心分離します。
9．上清を取り除き、125mlの氷冷済み滅菌水に懸濁します。4℃、3000×gで5分間遠心分離します。
10. 上清を取り除き、35mlの滅菌、氷冷済み1Mソルビトールに再懸濁します。細胞を氷冷済みのOakridgeチューブに移し、4℃、3000×gで5分間遠心分離します。
11. 静かに上清を取り除き、0.5mlの氷冷済み1Mソルビトールに再懸濁します。
12. 細胞は、エレクトロポレーションに使用する直前まで、氷上に保持します。

7.4.2　エレクトロポレーション

1．エレクトロポレーションを行うサンプル数に合わせて、1mlの1Mソルビトールを加えた17×100mm滅菌チューブを用意し、氷上におきます。0.2のキュベットを必要数用意し、氷上に保持します。
2．使用するDNA（0.1～1μg）を滅菌済みの1.5ml遠沈管に加え、氷上に保持します。
3．40μlのコンピテントセルをDNAに加え、静かに混和します。氷上で5分間静置します。
4．Gene Pulser XcellのHome画面からPre-set Protocols画面を開き、次いでFungal Protocols画面を開きます。C. albicansのProtocol Detail画面を開きます。詳細は§3.4に記載されています。
5．DNAと細胞の混合液をキュベットに入れ、軽くたたいてサンプルを底に集めます。キュベットをShockPodに設置し、ShockPodの蓋を閉じます。PULSEボタンを押します。
6．キュベットを取り出し、すぐに1mlの氷冷済み1Mソルビトールを加えます。細胞を静かに滅菌済み17×100mmチューブへ移します。
7．パルスの実効値等を確認、記録します。タイムコンスタントは5msec、電圧は1.5kV程度になります。
8．すぐに、1mlの1Mソルビトールを含む最小培地へ移します。30℃で4～6日間培養します。

7.4.3　溶液、試薬

1．YPD/uridine：10gのyeast　extractおよび20gのpeptoneを900mlの水に溶解します。オートクレーブし、100mlの滅菌済み20%グルコース、1mlの25mg/ml uridineを加えます。
2．YPD/ uridine寒天培地：10gのyeast extractおよび20gのpeptoneを900mlの水に溶解し、15gの寒天を加えます。オートクレーブし、100mlの滅菌済み20%グルコース、1mlの25mg/ml uridineを加えます。
3．1Mソルビトール：182.2gのソルビトールを800mlの水に溶解します。水で1ℓにメスアップし、オートクレーブします。
4．20%グルコース：20gのグルコースを60mlの水に溶解します。水で100mlにメスアップし、0.22μmのフィルターで除菌します。
5．5mM LiAc/10mM DTT：1mlの1M Lithium Acetate（10.2g/100ml）、20mlの0.1M DTT（1.54 g/100ml）、2mlの1M Tris (pH7.5)、0.4mlの0.5M EDTA、176.6mlの水を混合します。フィルターで除菌し、－20℃で保存します。

7.5　Dictyostelium discoideum

7.5.1　エレクトロコンピテントセルの調製

詳細な情報はHoward et al.(1988)、Knecht & Pang(1995)の文献に記載されています。
Gene Pulser Xcellの条件：矩形波、V=1.0kV、パルス幅1.0ms、パルス数2、パルスの間隔5sec
1．5～7×10^5cells/mlの細胞を500mlフラスコ内のHL5培地40mlに接種します。接種する細胞は、プレートもしくは液体培地から採取します。Dictyosteliumは、21℃では、およそ12時間で倍化します。

2．21°C、125rpmでおよそ24時間振盪培養します。コンピテントセルを調整する16～24時間前に、HL5培地を用いて細胞を7×10^5cells/mlに希釈します。21°C、125rpmで一晩振盪培養します。
3．培養液を、2本の滅菌済み50ml遠沈管に分注し、氷上に15分間静置します。
4．室温、400×gで5～7分間遠心分離します。
5．上清を取り除き、ペレットの入った遠沈管を氷上に静置します。
6．ペレットを50mlの滅菌、冷却済みEバッファーに再懸濁し、室温、400×gで5～7分間遠心分離します。
7．上清を取り除き、ペレットの入った遠沈管を氷上に静置します。細胞の濃度が1×10^7cells/mlとなるように再懸濁し、エレクトロポレーションに使用する直前まで、氷上に保持します。

7.5.2　エレクトロポレーション

1．使用するDNA（50μg以下）を滅菌済みの1.5ml遠沈管に加え、氷上に保持します。
2．800μlのコンピテントセルをDNAに加え、ピペットを用いて混和します。氷上で1分程度静置します。
3．Gene Pulser XcellのHome画面からPre-set Protocols画面を開き、次いでFungal Protocols画面を開きます。D. discoideumのProtocol Detail画面を開きます。詳細は§3.4に記載されています。
4．DNAと細胞の混合液を氷冷済みの0.4cmキュベットに入れ、軽くたたいてサンプルを底に集めます。キュベットをShockPodに設置し、ShockPodの蓋を閉じます。PULSEボタンを押します。このプロトコールでは、およそ5秒の間隔を置いてそれぞれ1msecのパルスが2回供給されます。
5．キュベットを取り出し、すぐに10mlの適当な培地で希釈します。
6．パルスの実効値等を確認、記録します。パルス幅は1msec、電圧は1.0kV程度になります。
7．栄養要求性変異株の相補性で選択する場合は、細胞を、栄養分を含まない最小培地へ移します。抗生物質への耐性で選択する場合は、21°Cで一晩培養した後、抗生物質を含む培地に播種します。

7.5.3　溶液、試薬

1．HL5培地：17.8gのbacteriological peptone（Oxoid,Ogdensburg,NY）、7.2gのyeast extract、0.54gのNa_2HPO_4、0.4gのKH_2PO_4、130μlのB12/葉酸混合液を水に溶解し、1ℓにメスアップします。pHを6.3～6.5に合わせます。2日以内に25分間オートクレーブします。使用前に20mlの50%グルコースと10mlの100×Antibiotic-Antimycotic（Life Technologies,Gaithersburg,MD）を加えます。
2．B12/葉酸混合液：5mgのB12と200mgの葉酸を95mlの水に溶解します。5NのNaOHを用いてpHを6.5～6.8に合わせます。100mlにメスアップし、フィルターで除菌します。－20°Cで遮光保存します。
3．Eバッファー：10mlの100mM NaH_2PO_4（KOHを用いてpHを6.1に調製）、10mlの0.5Mスクロース、80mlの水を混合し、オートクレーブします。

第8章　哺乳動物細胞のエレクトロポレーション

以下の手順にはGene Pulser Xcell main unitおよびCE moduleが必要です。

8.1　エレクトロコンピテントセルの調製

8.1.1　付着細胞

1．エレクトロポレーションを行う1～2日前に、細胞を、培地を含む75cm^{2}フラスコに移し、当日に50～70% confluentな状態になるようにします。ほとんどの細胞では、2～10×10^{6}cells/flask程度の密度になります。1回のエレクトロポレーションには1～10×10^{5}個の細胞が必要です。
2．培地を吸い出し、12ml程度のPBSで容器を洗浄します。
3．PBSを除き、0.4ml程度のtrypsin-EDTAを加えます。常温で2～5分程度保持し、フラスコを軽くたたいて細胞を遊離させます。
4．血清を含む10mlの培地を加えて、trypsinを中和します。
5．細胞を50mlの滅菌済み遠沈管に移し、室温、400×gで5～7分間遠心分離します。
6．培地を除き、エレクトロポレーション用のメディウム（Opti-MEM、血清を含まない培地、PBS、HEPES-buffered saline、Phosphate-buffered sucrose、HEPES-buffered sucrose等）に細胞を再懸濁します。このとき、細胞密度を1～5×10^{6}cells/mlとします。ピペットを用いて穏やかに攪拌し、single-cellの懸濁液を得ます。

8.1.2　浮遊細胞

1．エレクトロポレーションを行う1～2日前に、細胞を、培地を含む75cm^{2}フラスコに移し、当日が対数増殖期（一般には0.5～4×10^{6}cells/ml）になるようにします。1回のエレクトロポレーションには1～10×10^{5}個の細胞が必要です。
2．細胞を50mlの滅菌済み遠沈管に移し、室温、400×gで5～7分間遠心分離します。
3．培地を除き、エレクトロポレーション用のメディア（Opti-MEM、血清を含まない培地、PBS、HEPES-buffered saline、Phosphate-buffered sucrose、HEPES-buffered sucrose等）に細胞を再懸濁します。このとき、細胞密度を1～5×10^{6}cells/mlとします。ピペットを用いて穏やかに攪拌し、single-cellの懸濁液を得ます。Gene Pulser Xcellのプリセット・プロトコールを使用する場合は、Opti-MEMもしくは血清を含まない培地が適切です。

8.2　エレクトロポレーション

1．Gene Pulser Xcellに必要な条件を入力します。プリセット・プロトコールを使用する場合は、Home画面からPre-set Protocols画面を開き、次いでMammalian Pre-set Protocols画面を開きます。使用する細胞のProtocol Detail画面を開きます。詳細は§3.4に記載されています。
2．プラスミドをキュベットに加えます。必要なDNAの量は細胞種によって異なります。10～50μg/ml程度から条件検討を始めます。
3．細胞をキュベットに入れ、軽くたたいてDNAと混合します。表8.1には、細胞の量と濃度の指針が記載されています。
4．キュベットをShockPodに設置し、ShockPodの蓋を閉じます。PULSEボタンを押します。
5．すぐに0.5ml程度の培地を加え、パスツールピペットを用いて懸濁液を容器に移します。
6．容器を静かに揺らして、表面に細胞を展開します。37℃、多湿な環境下に維持します。
7．24～48時間後に、一過性発現の検証を行います。

表8.1　条件検討を始める際の細胞の濃度と量

キュベット (cm)	細胞の密度 (cells/ml)	サンプル容量 (μl)	エレクトロポレーション後の培養条件
0.2	1×10^{6}	100	48 well plate with 0.5 ml growth media
0.2	5×10^{6}	200	6 well plate with 2 ml growth media
0.4	2.5×10^{6}	400	6 well plate with 2 ml growth media

8.3　溶液、試薬

1．10%FBSを含む培地
2．Opti-MEM（Invitrogen）
3．Trypsin-EDTA：0.05%のtrypsin、0.53mMのEDTAをPBSに混合します（Invitrogen）。
4．Phosphate-buffered saline：137mMのNaCl、2.7mMのKC1、9.5mMのリン酸ナトリウム、pH7.3、オートクレーブします。
5．HEPES-buffered saline：10mMのHEPES（pH7.3）、140mMのNaCl、オートクレーブします。
6．Phosphate-buffered sucrose：272mMのスクロース、10mMのリン酸ナトリウム、pH7.3、フィルターで除菌します。
7．HEPES-buffered sucrose：272mMのスクロース、10mMのHEPES（pH7.3）、フィルターで除菌します。

第9章　引用文献

Anderson, M.L.M., Spandidos, D.A., and Coggins, J.R., Electroporation of lymphoid cells: factors affecting the efficiency of transfection, J. Biochem. Biophys. Meth., 22, 207 (1991).

Andreason, G.L. and Evans, G.A., Optimization of electroporation for transfection of mammalian cell lines, Anal. Biochem. 180, 279 (1989).

Apolinario, E., Nocero, M., Jin, M., and Hoffman, C.S., Cloning and manipulation of the Schizosaccharomyces pombe his7+ gene as a new selectable marker for molecular genetic studies, Curr. Genet. 24, 491 (1993).

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (eds.) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1987).

Barsoum, J., “Stable integration of vectors at high copy number for high-level expression in animal cells,” in Methods in Molecular Biology, vol. 48, Nickoloff, J.A. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ, p. 225 (1995).

Becker, D.M. and Guarente, L., High-efficiency transformation of yeast by electroporation, Methods Enzymol. 194, 182 (1991).

Böttger, E. C., High-efficiency generation of plasmid cDNA libraries using electro-transformation, BioTechniques 6, 878 (1988).

Bringel, F. and Hubert, J.-C., Optimized transformation by electroporation of Lactobacillus plantarum strains with plasmid vectors.

Calvin, N.M. and Hanawalt, P.C., High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation, J. Bacteriol. 170, 2796 (1988).

Chaffin, D.O. and Rubens, C.E., Blue/white screening of recombinant plasmids in Gram-positive bacteria by interruption of alkaline phosphatase gene (phoZ) expression, Gene 219, 91 (1998).

Chang, D.C., Chassy, B.M., Saunders, J.A., and Sowers, A.E. (eds.) Guide to Electroporation and Electrofusion, Academic Press, Inc., San Diego (1992).

Chu, G., Hayakawa, H., and Berg, P., Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA, Nuc. Acids Res. 15, 1311 (1987).

Cregg, J.M. and Russell, K.A., “Transformation,” in Methods in Molecular Biology, vol. 103, Higgins, D.R. and Cregg, J.M. (eds.), Humana Press, Totowa, NJ, p.27 (1998).

DeBacker, M.D., Maes, D., Vandoninck, S., Logghe, M., Contreras, R., and Luyten, W.H.M.L., Transformation of Candida albicans by electroporation, Yeast 15, 1609 (1999).

Dekeyser, R.A., Claes, B., deRycke, R.M.U., Habets, M.E., vanMontagu, M.C., and Caplan, A.B., Transient gene expression in intact and organized rice tissues, The Plant Cell 2, 591 (1990).

Dennis, J.J. and Sokol, P.A., “Electrotransformation of Pseudomonas,” in Methods in Molecular Biology, vol. 47, Nickoloff, J.A. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ, p. 125 (1995).

Dower, W. J., “Electroporation of bacteria: a general approach to genetic transformation,” in Genetic Engineering-Principles and Methods, vol 12, Plenum Publishing Corp., NY, p. 275 (1990).

Dower, W. J., Miller, J. F., and Ragsdale, C. W., High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation, Nuc. Acids Res. 16, 6127 (1988).

Dower, W.J., Chassy, B.M., Trevors, J.T., and Blaschek, H.P., “Protocols for the transformation of bacteria by electroporation,” in Guide to Electroporation and Electrofusion, Chang, D. C., Chassy, B. M., Saunders, J. A., and Sowers, A. E. (eds.), Academic Press Inc., p. 485, San Diego (1992).

Drabeck, J.J., Glasspool-Malone, J., Somiari, S., King, A.., and Malone, R.W., Cutaneous transfection and immune responses to intradermal nucleic acid vaccination are significantly enhanced by in vivo electropermeabilization, Mol. Ther. 3, 249 (2001).

Fromm, M., Callis, J., Taylor, L.P., and Walbot, V., “Electroporation of DNA and RNA into plant protoplasts”, in Methods in Enzymology, vol. 153, Academic Press Inc., p. 351, San Diego (1987).

Gaertig, J. and Gorovsky, M.A., “Gene transfer by electroporation in Tetrahymena,” in Methods in Molecular Biology, vol. 47, Nickoloff, J.A. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ, p. 331 (1995).

Heery, D. M., and Dunican, L. K., Improved efficiency M13 cloning using electroporation, Nuc. Acids Res. 17, 8006 (1989).

Heiser, W.C., “Optimizing electroporation conditions for the transformation of mammalian cells,” in Methods in Molecular Biology, vol. 130, Tymms, M.J. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ, p. 117 (2000).

Heller, R., Jaroszeski, M., Atkin, A., Moradpour, D., Gilbert, R., Wands, J., and Nicolau, C., In vivo gene electroinjection and expression in rat liver, FEBS Lett. 389, 225 (1996).

Hui, S.W., “Effects of pulse length and strength on electroporation efficiency,” in Methods in Molecular Biology, vol. 48, Nickoloff, J.A. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ, p. 195 (1995).

Howard, P.K., Ahern, K.G., and Firtel, R.A., Establishment of a transient expression system for Dictyostelium discoideum, Nuc. Acids Res. 16, 2613 (1988).

Jacobs, M., Wnendt, S., and Stahl, U., High-efficiency electro-transformation of Escherichia coli with DNA from ligation mixtures, Nuc. Acids Res. 18, 1653 (1990).

Joersbo, M. and Brunstedt, J., Electroporation: mechanism and transient expression, stable transformation and biological effects in plant protoplasts, Physiol. Plant 81: 256 (1991).

Knecht, D. and Pang, K.M., “Electroporation of Dictyostelium discoideum,” in Methods in Molecular Biology, vol. 47, Nickoloff, J.A. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ, p. 321 (1995).

Knutson, J.C. and Yee, D., Electroporation: parameters affecting transfer of DNA into mammalian cells, Anal. Biochem. 164, 44 (1987).

Lee, J.C., “Electrotransformation of Staphylococci,” in Methods in Molecular Biology, vol. 47, Nickoloff, J.A. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ, p. 209 (1995).

Leonardo, E. D., and Sedivy, J. M., A new vector for cloning large eukaryotic DNA segments in Escherichia coli, Bio/Technol. 8, 841 (1990).

Lin, J.-J., “Electrotransformation of Agrobacterium,” in Methods in Molecular Biology, vol. 47, Nickoloff, J.A. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ, p. 171 (1995).

Miller, E.M. and Nickoloff, J.A., “Escherichia coli electrotransformation,” in Methods in Molecular Biology, vol. 47, Nickoloff, J.A. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ, p. 105 (1995).

Neumann, E., Kakorin, S., and Toensing, K., “Principles of membrane electroporation and transport of macromolecules,” in Methods in Molecular Medicine vol 37, Jaroszeski, M.J., Heller, R., and Gilbert, R. (eds.), Humana Press, Totowa, NJ, p. 1 (2000).

Nickoloff, J.A. (ed.) Methods in Molecular Biology, vol. 47, Humana Press, Totowa, NJ, (1995a).

Nickoloff, J.A. (ed.) Methods in Molecular Biology, vol. 48, Humana Press, Totowa, NJ, (1995b).

Prentice, H.L., High efficiency transformation of Schizosaccharomyces pombe by electroporation, Nuc. Acids Res., 20, 621 (1991).

Potter, H., Weir, L., and Leder, P., Enhancer-dependent expression of human k immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation, Proc. Nat. Acad. Sci. 81, 7161 (1984).

Shigekawa, K. and Dower, W.J., Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: A general approach to the introduction of macromolecules into cells, Biotechniques 6, 742 (1988).

Shillito, R.D., Saul, M.W., Paszkowski, J., Muller, M., and Potrykis, I., High efficiency direct gene transfer to plants, Bio/Technology 3, 1099 (1985).

Showe, M.K., Williams, D.L., and Showe, L.C., Quantitation of transient gene expression after electroporation, Nuc. Acids Res. 20, 3153 (1990).

Silo-Suh, L.A., Lethbridge, B.J., Raffel, S.J., He, H., Clardy, J., and Hanelsman, J., Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by Bacillus cereus UW85, Appl. Environ. Microbiol. 60, 2023 (1994).

Simon, D. and Ferretti, J.J., Electrotransformation of Streptococcus pyogenes with plasmid and linear DNA, FEMS Micobiol. Lett. 82, 219 (1991).

Smith, A.W. and Iglewski, B.H., Transformation of Pseudomonas aeruginosa by electroporation, Nuc. Acids Res. 17, 10509 (1989).

Suzuki, T., Shin, B.-C., Fujikura, K., Matsuzaki, T., and Takata, K., Direct gene transfer into rat liver cells by in vivo electroporation, FEBS Lett. 425, 436 (1998).

Thompson, J.R., Register, E., Curotto, J., Kurtz, M., and Kelly, R., An improved protocol for the preparation of yeast cells for transformation by electroporation, Yeast 14, 565 (1998).

Trevors, J.T., Chassy, B.M., Dower, W.J., and Blaschek, H.P., “Electrotransformation of bacteria by plasmid DNA,” in Guide to Electroporation and Electrofusion, Chang, D. C., Chassy, B. M., Saunders, J. A., and Sowers, A. E. (eds.), Academic Press Inc., p. 265, San Diego (1992).

Willson, T. A., and Gough, N. M., High voltage E. coli electro-transformation with DNA following ligation, Nuc. Acids Res. 16, 11820 (1988).

Zabarovsky, E. R., and Winberg, G., High efficiency electroporation of ligated DNA into bacteria, Nuc. Acids Res. 18, 5912 (1990).

第10章　仕様と製品情報

10.1　仕様

Gene Pulser Xcellコンプリートシステム

入力電圧	100-120VACまたは220-240VAC、50/60Hz
消費電力	240W
使用環境	温度：0-35℃、湿度：0-95%
規格	安全性 EN61010、EMC EN61326 Class A
サイズ（W×D×H)	main unit ：31×30×14cm
	CE module : 31×28× 9cm
	PC module : 31×28× 5cm
重量	main unit ：6.62kg
	CE module : 3.08kg
	PC module : 1.90kg
出力波形	エクスポネンシャル、スクエア

低電圧回路（CE module使用）

設定電圧（V）	10〜500（2刻み）
コンデンサー容量（μF）	25〜3275（25刻み）
設定抵抗値（Ω）	なし
サンプルの抵抗値（Ω）	最低20
スクエアパルス長（msec）	0.05〜100
スクエアパルス数	1〜10
スクエアパルス間隔（sec）	0.1〜10

高電圧回路（PC module使用）

設定電圧（V）	200〜3000（10刻み）
コンデンサー容量（μF）	10、25、50
設定抵抗値（Ω）	50〜1000（50刻み）、∞
サンプルの抵抗値（Ω）	最低　20（200〜2500V設定時）
	最低 600（2500〜3000V設定時）
スクエアパルス長（msec）	0.05〜5
スクエアパルス数	1〜2
スクエアパルス間隔（sec）	5〜30

10.2　製品情報

Ordering Information

カタログ番号	製品名
165-2660J1	Gene Pulser Xcellコンプリートシステム
	構成内容 Gene Pulser Xcell main unit Gene Pulser Xcell CE module Gene Pulser Xcell PC module Gene Pulser Xcell ShockPod エレクトロポレーションキュベット0.1cm, 0.2cm, 0.4cm 各50個
165-2661J1	Gene Pulser Xcell CEシステム
	構成内容 Gene Pulser Xcell main unit Gene Pulser Xcell CE module Gene Pulser Xcell ShockPod エレクトロポレーションキュベット0.2cm, 0.4cm 各50個
165-2662J1	Gene Pulser Xcell PCシステム
	構成内容 Gene Pulser Xcell main unit Gene Pulser Xcell PC module Gene Pulser Xcell ShockPod エレクトロポレーションキュベット0.1cm, 0.2cm 各50個
165-2666J1	Gene Pulser Xcellコアユニット
	構成内容 Gene Pulser Xcell main unit Gene Pulser Xcell ShockPod

165-2666	Gene Pulser Xcell main unit
165-2667	Gene Pulser Xcell CE module
165-2668	Gene Pulser Xcell PC module
165-2669	Gene Pulser Xcell ShockPod

165-2086	エレクトロポレーションキュベット0.2cm 50個
165-2088	エレクトロポレーションキュベット0.4cm 50個
165-2089	エレクトロポレーションキュベット0.1cm 50個


日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社

ライフサイエンス
事業本部

本　　社	〒116-0014 東京都荒川区東日暮里5-7-18 コスモパークビル	☎ (03) 5811-6270 FAX. (03) 5811-6272
神奈川営業所	〒222-0033 横浜市港北区新横浜2-7-3 フジビル	☎ (045) 476-0351 FAX. (045) 476-0350
つくば営業所	〒305-0031 つくば市吾妻1-15-1 筑波司法会館	☎ (029) 852-0835 FAX. (029) 852-0829
大阪営業所	〒532-0025 大阪市淀川区新北野1-14-11 第一生命ビル	☎ (06) 6308-6568 FAX. (06) 6308-3064
名古屋営業所	〒465-0093 名古屋市名東区一社3-121-1 MIDORIビル	☎ (052) 702-2358 FAX. (052) 702-2812
福岡営業所	〒812-0013 福岡市博多区博多駅東2-18-30 八重洲博多ビル	☎ (092) 475-4856 FAX. (092) 475-4858
	※技術的お問い合わせは	☎ (03) 5811-6271 FAX. (03) 5811-6272

M5146-0303

http://discover.bio-rad.co.jp